



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KEMIJSKI ODSJEK

Nives Ivić

**STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA
BAKTERIJSKE GLICIN:[PROTEIN-
NOSAČ]-LIGAZE I NJENIH KOMPLEKSA
SA SUPSTRATIMA**

DOKTORSKI RAD

ZAGREB, 2013.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Nives Ivić

**STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF
BACTERIAL GLYCINE:[CARRIER
PROTEIN] LIGASE AND ITS
COMPLEXES WITH SUBSTRATES**

DOCTORAL THESIS

ZAGREB, 2013.



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KEMIJSKI ODSJEK

NIVES IVIĆ

**STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA
BAKTERIJSKE GLICIN:[PROTEIN-
NOSAČ]-LIGAZE I NJENIH KOMPLEKSA
SA SUPSTRATIMA**

DOKTORSKI RAD

Mentorica:
dr. sc. Marija Luić

ZAGREB, 2013.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Nives Ivić

**STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF
BACTERIAL GLYCINE:[CARRIER
PROTEIN] LIGASE AND ITS
COMPLEXES WITH SUBSTRATES**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. Marija Luić

ZAGREB, 2013.

Ova je disertacija izrađena u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju
Zavoda za fizičku kemiju na Institutu Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Marije
Luić.

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Mariji Luić na pruženoj prilici za izradu ove disertacije, podršci tijekom rada, te srdačnom odnosu.

Zahvaljujem se akademkinji Ivani Weygand-Đurašević na ukazanom povjerenju i izvanrednoj suradnji tijekom izrade čitave disertacije.

Dr. sc. Marku Močibobu se zahvaljujem na pročišćenim proteinima bez kojih uopće ne bi bilo ove disertacije, na ugodnoj suradnji, svim poticajima i brojnim raspravama.

Dr. sc. Silviji Bilokapić zahvaljujem na njenim uvijek zanimljivim komentarima i idejama, te velikoj podršci.

Dr. sc. Biserki Kojić-Prodić zahvaljujem što me uputila na tečajeve i škole koji su bili od neprocjenjivog značenja za moje znanje kristalografije, te što je jednim okom uvijek pazila na mene i našla riječ utjehe i motivacije baš kada je trebalo. Zahvaljujem se i svim ostalim članovima Laboratorija za kemijsku i biološku kristalografiju na predivnoj atmosferi i ugodnim druženjima, a posebno Igoru Sabljiću na pomoći kod printanja disertacije.

Zahvaljujem se znanstvenicima koji rade na sinkrotronskoj zruci BM14 (ESRF) na pomoći prilikom prikupljanja podataka, a posebno dr. sc. Hassan Belrhaliu što me primio na mjesec dana u svoju grupu.

Dr. sc. Pavel Afoninu zahvaljujem na susretljivosti i izvrsnim savjetima vezanim uz utočnjavanje strukture protein-protein kompleksa, posebno prostetičke skupine.

Na kraju najveće hvala mojoj obitelji, prijateljima i svima bliskima koji su me podržali na ovom neočekivanom i uzbudljivom putovanju.

SADRŽAJ

Sadržaj	xiii
Sažetak	xv
Abstract	xvii
1 UVOD	1
2 LITERATURNI PREGLED	3
2.1 Aminoacil-tRNA-sintetaze	3
2.2 Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza	4
2.3 Raznolikost aminoacil-tRNA-sintetaza	6
2.4 Paralozi aminoacil-tRNA-sintetaza	7
2.4.1 HisZ – paralog histidil-tRNA-sintetaze	7
2.4.2 Paralog aspartil-tRNA-sintetaze sudjeluje u biosintezi asparagina	8
2.4.3 YadB – paralog GluRS koji veže Glu na antikodon tRNA ^{Asp}	8
2.4.4 MshC sudjeluje u biosintezi mikotiola	10
2.4.5 PoxA veže elongacijski faktor P	10
2.4.6 Ciklodipeptid-sintaze su strukturni homolozi aaRS podrazreda Ic	11
2.5 Seril-tRNA-sintetaze	12
2.6 Proteini slični seril-tRNA-sintetazama	16
2.7 Aminokiselina:[protein-nosač]-ligaze	17
2.8 Adenilat-formirajući enzimi	18
2.9 Raznolike uloge protein-nosača	19
3 MATERIJALI I METODE	25
3.1 Materijali	25
3.1.1 Korištene kemikalije	25
3.1.2 Komercijalni kompleti	25
3.1.3 Materijali korišteni u kristalizaciji proteina	25
3.2 Metode	26
3.2.1 Kloniranje, nadekspresija i pročišćavanje <i>B. japonicum</i> glicin:[protein-nosač]-ligaze 1, hibrida glicin:[protein-nosač]-ligaze, te <i>B. japonicum</i> i <i>A. tumefaciens</i> protein-nosača	26
3.2.2 Kristalizacija proteina	27
3.2.2.1 Metoda strujanja para	27
3.2.2.2 Kristalizacija u kapilari	28
3.2.2.3 Kristalizacija <i>B. japonicum</i> glicin:[protein-nosač]-ligaze 1	29
3.2.2.4 Priprema i kristalizacija kompleksa <i>B. japonicum</i> glicin:[protein-nosač]-ligaze i odgovarajućeg protein-nosača (Bj CP)	30
3.2.2.5 Priprema i kristalizacija kompleksa hibridne glicin:[protein-nosač]-ligaze i <i>A. tumefaciens</i> protein-nosača (At CP)	30
3.2.3 Namakanje kristala u otopinama malih liganda	31
3.2.4 Priprema kristala za snimanje na sobnoj temperaturi	31

3.2.5 Hlađenje proteinskih kristala	32
3.2.6 Difrakcija rendgenskih zraka na kristalu	32
3.2.7 Metode rješavanja trodimenzijskih struktura rendgenskom difrakcijom	33
3.2.7.1 SAD eksperiment (eng. <i>single-wavelength anomalous dispersion</i>)	34
3.2.7.2 Metoda molekulske zamjene	35
3.2.7.3 Izgradnja modela	36
3.2.7.4 Utočnjavanje modela	37
3.2.7.5 Analiza i interpretacija struktura	37
3.2.8 Kontrolirana dehidracija proteina	38
4 REZULTATI	39
4.1 Određivanje kristalne strukture <i>B. japonicum</i> glicin:[protein-nosač]-ligaze 1	39
4.2 Struktura <i>B. japonicum</i> glicin:[protein-nosač]-ligaze 1 i usporedba s metanogenim tipom seril-tRNA-sintetaze	42
4.3 Strukturna analiza aktivnog mjesta Bj Gly:CP-ligaze 1	44
4.4 Vezanje malih supstrata u aktivno mjesto Bj Gly:CP-ligaze 1	45
4.5 Vezanje analoga glicil-adenilata u aktivno mjesto Bj Gly:CP-ligaze 1	47
4.6 Struktura Bj Gly:CP-ligaze 1 u kompleksu s koenzimom A	48
4.7 Kristalizacija i određivanje strukture kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 i odgovarajućeg protein-nosača	50
4.8 Kompleks Bj Gly:CP-ligaze 1 i Bj CP-a otkriva mjesto vezanja dvaju proteina	53
4.9 Kompleks Bj Gly:CP-ligaze 1 i Bj CP s malim ligandima vezanim u aktivno mjesto	55
4.10 Struktura hibridne Gly:CP-ligaze u kompleksu s At CP	58
5 RASPRAVA	63
5.1 Selektivnost aa:CP-ligaza prema odgovarajućoj aminokiselini	63
5.2 Redoslijed vezanja i konformacijske promjene izazvane vezanjem supstrata	66
5.3 Mehanizam djelovanja <i>B. japonicum</i> glicin:[protein-nosač]-ligaze 1	67
5.4 Važnost prisutnosti prostetičke skupine Ppant u formiranju ligaza-CP kompleksa	69
5.5 Prepoznavanje odgovarajućeg protein-nosača	70
5.6 Uloga aminokiselina:[protein-nosač]-ligaza	72
6 ZAKLJUČCI	75
7 LITERATurna VRELA	77
8 PRILOZI	83
8.1 Popis riješenih struktura	83
8.2 Popis kratica	83
9 ŽIVOTOPIS I POPIS RADOVA	85

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijски odsjek

Doktorska disertacija

STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA BAKTERIJSKE GLICIN:[PROTEIN-NOSAČ]-LIGAZE I NJENIH KOMPLEKSA SA SUPSTRATIMA

NIVES IVIĆ

Laboratorij za kemijsku i biološku kristalografiju, Zavod za fizičku kemiju,
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10 002 Zagreb

Nedavno je otkrivena nova porodica enzima sličnih metanogenom tipu seril-tRNA-sintetaza. Nazvani aminokiselina:[protein-nosač]-ligaze, ovi homolozi umjesto serina tioesterski vežu glicin ili alanin na odgovarajući protein-nosač (CP) umjesto na tRNA. U ovom radu je strukturno okarakteriziran član te porodice; glicin:[protein-nosač]-ligaza 1 (Bj Gly:CP-ligaza 1) iz bakterije *Bradyrhizobium japonicum*. Usporedba kristalnih struktura Bj Gly:CP-ligaze 1 i metanogenog tipa seril-tRNA-sintetaze je otkrila strukturnu očuvanost katalitičke domene i aktivnog mjesta enzima. Strukture Bj Gly:CP-ligaze 1 u kompleksu s malim supstratima (ATP-om i analogom glicil-adenilata) su ukazale na potencijalne aminokiseline odgovorne za diskriminaciju glicina i očuvanost mehanizma aktivacije glicina. Analiza strukture kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 i odgovarajućeg CP-a je otkrila međudjelovanje proteina isključivo preko CP-vezne zavojnice karakteristične za aminokiselina:[protein-nosač]-ligaze. Dizajnirana je hibridna Gly:CP-ligaza u kojoj je CP-vezna zavojnica iz Bj Gly:CP-ligaze 1 zamijenjena odgovarajućom iz *Agrobacterium tumefaciens* alanin:[protein-nosač]-ligaze. Usporedbom kompleksa ligaza s odgovarajućim CP-om razjašnjena je strukturna osnova na temelju koje aa:CP-ligaze razlikuju protein-nosače.

XVII + 88 stranice, 47 slika, 8 tablica, 94 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu i Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: biomakromolekulska kristalografija / aminokiselina:[protein-nosač]-ligaza / homolog seril-tRNA-sintetaze / protein-nosač / *Bradyrhizobium japonicum*

Mentor: Dr. sc. Marija Luić, zn. savj. IRB i nasl. red. prof. PMF

Ocjenjivači: Dr. sc. Ivana Weygand-Đurašević, red. prof.
Dr. sc. Marija Luić, zn. savj. IRB i nasl. red. prof.
Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof.

Rad prihvaćen: 03. travnja 2013.

ABSTRACT

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF BACTERIAL GLYCINE:[CARRIER PROTEIN] LIGASE AND ITS COMPLEXES WITH SUBSTRATES

NIVES IVIĆ

Laboratory for Chemical and Biological Chemistry, Department of Physical Chemistry,
Rudjer Boskovic Institute, Bijenicka 54, 10 002 Zagreb

Recently, a new family of methanogenic seryl-tRNA synthetase-like enzymes was discovered. Named amino acid:[carrier protein] ligases, these homologs catalyze thioester bonding of glycine or alanine, as opposed to serine, to the cognate carrier protein (CP), instead of to tRNA. In this work, one representative member of the family, glycine:[carrier protein] ligase 1 (Bj Gly:CP ligase 1) from *Bradyrhizobium japonicum*, was structurally characterized. A comparison of the resulting crystal structure with methanogenic type seryl-tRNA synthetase revealed high similarities between the respective catalytic domains and active sites. Structures of Bj Gly:CP ligase 1, complexed with small substrates (ATP and glycyl-adenylate analogue), indicated active site residues that are potentially responsible for glycine discrimination and preservation of the glycine activation mechanism. Structural analysis of Bj Gly:CP ligase 1 complexed with the cognate CP showed that the interaction is achieved mainly through the CP-binding helix, which is characteristic for amino acid:[carrier protein] ligases. Consequently, a hybrid Gly:CP ligase was designed by replacing the CP-binding helix from Bj Gly:CP ligase 1 with its counterpart from *Agrobacterium tumefaciens* alanine:[carrier protein] ligase. Comparison of the two ligases, complexed with cognate CPs, revealed the molecular basis by which aa:CP ligases discriminate carrier proteins.

XVII + 88 pages, 47 figures, 8 tables, 94 references, original in Croatian

Thesis deposited in National and University Library in Zagreb and the Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: biomacromolecular crystallography / amino acid:[carrier protein] ligase / seryl-tRNA synthetase homolog / carrier protein / *Bradyrhizobium japonicum*

Supervisor: Dr. Marija Luić, Senior Scientist

Reviewers: Dr. Ivana Weygand-Đurašević, Professor
Dr. Marija Luić, Senior Scientist
Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Professor

Thesis accepted: April 3rd, 2013

1 UVOD

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji sudjeluju u procesu biosinteze proteina na ribosomima.¹ U reakciji aminoacilacije odgovarajuća aminokiselina se kovalentno veže na 3'-kraj izoakceptorske tRNA koja zatim stvara interakcije s ribosomom gdje služi u prijevodu nukleotidnog slijeda u proteinsku sekvencu. Zbog njihove esencijalne uloge, smatra se da su aaRS evolucijski vrlo stari enzimi. Klasična Crickova hipoteza adaptora je pretpostavila postojanje 20 različitih aminoacil-tRNA-sintetaza, po jednu za svaku od 20 prirodnih aminokiselina.² No, sve bržim sekvencioniranjem i analizom genoma brojnih organizama nađeno je da neki organizmi posjeduju manje od 20 enzima potrebnih za aminoacilaciju, dok drugi posjeduju dodatne višestruke kopije gena za aaRS, kao i otvorene okvire čitanja za njihove pojedine domene.³ Rana pojava aaRS u evoluciji omogućila im je razvoj dodatnih domena i insercija koje su im dale ne samo svojstvo visoke specifičnosti prema svojim supstratima, već i mogućnost obavljanja novih funkcija koje nisu direktno povezane sa sintezom proteina.³ Brojnim duplikacijama čitavih gena za aaRS ili samo njihovih dijelova nastala je velika skupina proteina sličnih aminoacil-tRNA-sintetazama koji su stekli neke potpuno nove funkcije, od kojih je većina još uvijek nedovoljno istražena.

Aminoacil-tRNA-sintetaze su obzirom na sekvencu, oligomerno stanje i građu katalitičke domene podijeljene u dva razreda. Razredu II aaRS pripadaju seril-tRNA-sintetaze (SerRS), enzimi koji kovalentno vežu serin na odgovarajuću tRNA^{Ser}. Filogenetskom analizom je ustanovljeno postojanje dviju evolucijski udaljenih grupa SerRS u prirodi: bakterijski tip SerRS nađen kod arheja, bakterija i eukariota, te metanogeni tip SerRS (mSerRS) nađen kod većine metanogenih arheja.⁴ Oba tipa SerRS su strukturno i biokemijski okarakterizirani.⁵⁻⁷ Iako oba tipa tvore homodimere, njihove strukture i mehanizam djelovanja znatno se razlikuju. Osim različito građenih tRNA-veznih domena, nađeno je i da imaju različite mehanizme prepoznavanja serina.⁷ Za razliku od bakterijskog tipa, u aktivnom mjestu mSerRS se nalazi ion cinka koordiniran s tri očuvane aminokiseline (Cys, Glu i Cys) i molekulom vode koju vezanjem u aktivno mjesto zamjenjuje amino-skupina supstrata serina. Vezanjem serina dolazi do formiranja tzv. „serinske omče“ čime se zatvara dio aktivnog mjesta i pravilno smješta serin za reakciju.

Detaljnim analizama sekvencioniranih bakterijskih genoma su nađeni otvoreni okviri čitanja za krnje homologe mSerRS kojima nedostaje domena za vezanje tRNA. Pokazano je kako su ovi homolozi promijenili specifičnost prema oba supstrata, aminokiselini serinu i molekuli tRNA. Kinetičkim testovima je otkriveno kako umjesto serina vežu glicin ili alanin, koji aktiviraju pomoću ATP-a, te ih kovalentno vežu na odgovarajući protein-nosač (CP, eng. *carrier protein*).⁸ Promjenom vrste reakcije koju obavljaju, ovi krnji homolozi mSerRS su nazvani aminokiselina:[protein-nosač]-ligaze (aa:CP-ligaze).⁸

Kako bi se detaljnije istražio mehanizam i uloga djelovanja ove novootkrivene porodice enzima, potrebno ih je analizirati na razini 3D-strukture. Cilj istraživanja ove disertacije je strukturno okarakterizirati jednog predstavnika skupine aa:CP-ligaza. Da bi se to postiglo, riješene su trodimenzijske strukture glicin:[protein-nosač]-ligaze 1 iz vrste *Bradyrhizobium japonicum* (Bj Gly:CP-ligaza 1) i njenih šest kompleksa, te uspoređene s već riješenom strukturom seril-tRNA-sintetaze metanogenog tipa.⁷ Sve trodimenzijske strukture proteina u ovom radu su određene metodom difrakcije rendgenskih zraka na jediničnom kristalu. Kako bi se otkrio način prepoznavanja i vezanja supstrata na enzim, te kako aa:CP-ligaza razlikuje slične aminokiseline, riješena je i analizirana struktura Bj Gly:CP-ligaze 1 u kompleksu s adenzin-trifosfatom (ATP), analogom glicil-adenilata (GlyAMS), te koenzimom A (CoA). Riješene strukture pružaju uvid u način vezanja supstrata u aktivno mjesto, te ukazuju na očuvani prvi korak mehanizma djelovanja aa:CP-ligaza. Kako bi se otkrilo mjesto međudjelovanja Bj Gly:CP-ligaze 1 i odgovarajućeg protein-nosača (Bj CP), kokristaliziran je njihov kompleks i riješena trodimenzijska struktura. Uvid u mehanizam prijenosa aktivirane aminokiseline na prostetičku skupinu protein-nosača pružile su strukture kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 i Bj CP s malim supstratima u aktivnom mjestu (GlyAMS, ATP, glicin + ATP). Način na koji aa:CP-ligaze prepoznaju odgovarajući CP je otkriven riješavanjem strukture hibridne Gly:CP-ligaze u kompleksu s CP-om iz vrste *Agrobacterium tumefaciens* (At CP), te usporedba s kompleksom Bj Gly:CP-ligaze 1 i Bj CP. Ovo detaljno istraživanje aa:CP-ligaza na makromolekularnoj razini značajno je doprinijelo razumijevanju načina njihovog djelovanja i funkcije.

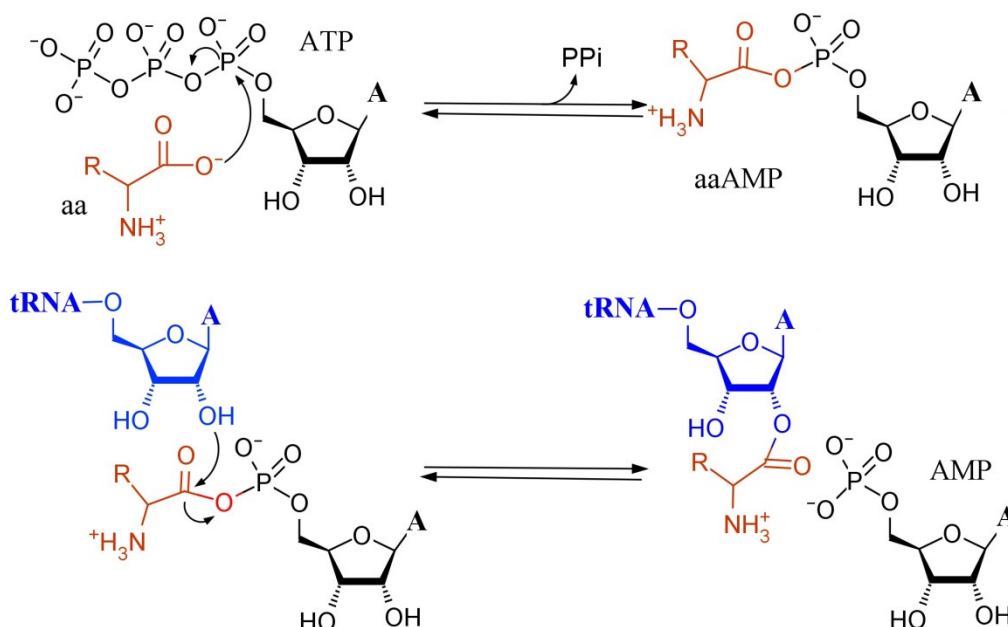
2 LITERATURNI PREGLED

2.1 Aminoacil-tRNA-sintetaze

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) imaju ključnu ulogu u biosintezi proteina. To su enzimi koji kataliziraju reakciju aminoacilacije vezanjem odgovarajuće aminokiseline na izoakceptorsku molekulu tRNA. Aminoacilirane molekule tRNA zatim sudjeluju u procesu translacije, tj. biosinteze proteina na ribosomu. Translacija je jedan od temeljnih bioloških procesa u kojem se nasljedna uputa data slijedom nukleotida u mRNA prevodi u slijed aminokiselina u proteinu. Aminoacilirane molekule tRNA donose aminokiselinu na ribosom na kojem dolazi do katalize stvaranja peptidne veze između aminokiselina te nastaje novi protein. Molekule tRNA sadrže antikodon koji im omogućuje prepoznavanje odgovarajućeg kodona na mRNA čime se osigurava vjernost prijenosa genetičke informacije. Prepoznavanje točne aminokiseline i vezanje na odgovarajuću tRNA također je od iznimne važnosti u osiguravanju točnosti procesa biosinteze proteina. Zbog toga su aaRS razvile mehanizme koji im omogućuju visoku specifičnost prilikom odabira točne aminokiseline i tRNA.

Reakcija aminoacilacije se odvija u dva koraka. U prvom koraku se aminokiselina aktivira pomoću molekule ATP-a te nastaje miješani anhidrid aminoacil-adenilat (aaAMP) i pirofosfat (PP_i , slika 2.1). Reakcija se odvija mehanizmom bimolekulske nukleofilne supstitucije (S_N2) pri čemu α -karboksilatna skupina aminokiseline nukleofilno napada α -fosfat ATP-a. Aminoacil-adenilat ostaje nekovalentno vezan u aktivnom mjestu enzima, dok se pirofosfat oslobađa i napušta aktivno mjesto. U drugom koraku reakcije se aminokiselinski dio s aminoacil-adenilata prenosi na 2'- ili 3'-hidroksilnu skupinu šećera adenzina 3'-kraja tRNA pri čemu nastaje aminoacil-tRNA i molekula adenzin-monofosfata (AMP) koje zatim disociraju s enzima (slika 2.1). U ovom slučaju nukleofil je 2'- ili 3'-hidroksilna skupina 3'-kraja tRNA koja napada α -karbonilni ugljik aminokiselinskog dijela aaAMP-a. Hidrolizom ATP-a se dobiva energija potrebna za aminoacilaciju tRNA, tj. stvaranje esterske veze između hidroksilne skupine riboze molekule tRNA i karboksilne skupine aminokiseline. Oslobođeni pirofosfat hidrolizira pirofosfataza, čime se ravnoteža reakcije pomiče u smjeru aktiviranja aminokiseline. Iako su strukturno i evolucijski vrlo različiti, predloženo je da se aaRS obzirom na prvi korak reakcije aktivacije aminokiseline ATP-om priključe velikoj porodici adenilat-formirajućih enzima.⁹

Kako je vjernost translacije osigurana točnim spajanjem svake aminokiseline sa setom njenih odgovarajućih, izoakceptorskih tRNA, tijekom evolucije su se u svim organizmima razvile zasebne aminoacil-tRNA-sintetaze s visokom specifičnošću za svaku aminokiselinu, osim u nekoliko bakterija kojima nedostaju AsnRS i/ili GlnRS.¹



Slika 2.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze kataliziraju aminoacilaciju tRNA. U prvom koraku dolazi do aktivacije aminokiseline nukleofilnim napadom karboksilne skupine na α -fosfat ATP-a pri čemu se oslobađa pirofosfat (PP_i) i nastaje aminoacil-adenilat kao međuprodukt. Drugi korak reakcije uključuje nukleofilni napad 2'- ili 3'-OH skupine terminalne riboze molekule tRNA na aminoacil-adenilat pri čemu nastaju AMP i aminoacil-tRNA.

2.2 Podjela aminoacil-tRNA-sintetaza

Unatoč velikoj raznolikosti aminoacil-tRNA-sintetaza obzirom na aminokiselinsku sekvencu, veličinu i kvaternu strukturu, usporedba aminokiselinskih sljedova aaRS i dostupnih trodimenzijskih struktura podijelila je aaRS u dva zasebna razreda.

Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda I su najčešće monomeri, od kojih svi imaju očuvana dva aminokiselinska motiva: HIGH i KMSKS. Katalitička domena sadrži Rossmannovu strukturu koja je poznata kao klasična nukleotid vezna-struktura građena od paralelne β -ploče okružene α -zavojnica. Poznato je da Rossmannovu strukturu sadrže brojni proteini koji imaju sposobnost vezanja nukleotida. Motivi HIGH i KMSKS su dio Rossmannove strukture, te sudjeluju u vezanju ATP-a pri čemu histidini i lizini iz motiva stabiliziraju njegov trifosfatni dio. ATP se veže u aktivno mjesto aaRS razreda I u ispruženoj konformaciji, slično načinu vezanja kod drugih proteina koji sadrže Rossmannovu strukturu.¹⁰

Međuprodukt nastao prvim korakom reakcije, aminoacil-adenilat ima svijenu konformaciju u aktivnom mjestu, najvjerojatnije jer aminokiselina pristupa α -fosfatu ATP-a sa strane. U drugom koraku reakcije, aminokiselinski dio se prenosi na 2'-hidroksilnu skupinu adenoзина na 3'-kraju tRNA.

Aminoacil-tRNA-sintetaze razreda II najčešće tvore dimere, te imaju očuvana tri aminokiselinska motiva: motiv 1, 2 i 3. Motivi su dio katalitičke domene koja je građena od 7-lančane antiparalelne β -ploče okružene α -zavojnica i predstavlja drugačiji način vezanja ATP-a od uobičajenog. Motiv 1 se sastoji od α -zavojnice i β -lanca s očuvanim prolinom te ima ulogu u dimerizaciji. Motiv 2 je građen od 2 β -lanca povezana omčom. Motiv 3 se sastoji od β -lanca iza kojeg slijedi α -zavojnica. Oba motiva sadrže visoko očuvane aminokiseline bitne za vezanje aminokiseline i ATP-a, te katalizu. Za razliku od aaRS razreda I, one vežu ATP u svijenoj konformaciji, pri čemu ga stabiliziraju konzervirani fenilalanin motiva 2 i konzervirani arginini motiva 2 i 3. Svijena konformacija ATP-a dovodi mnogo negativno nabijenih skupina u blizinu, te je uz ATP u aktivnom mjestu obično prisutno i nekoliko iona Mg^{2+} (2-3) koji uz arginine stabiliziraju trifosfatni dio ATP-a. Aminoacil-adenilat poprima ispruženu konformaciju, što je objašnjeno kao posljedica izravnog napada karboksilne skupine aminokiseline na svinuti ATP.¹⁰ Kod aaRS razreda II aktivirana aminokiselina se prenosi na 3'-hidroksilnu skupinu riboze tRNA.

Riješene su trodimenzijske strukture svih predstavnika aaRS, od čega mnoge i u kompleksu s odgovarajućom tRNA.¹¹ aaRS razreda I vežu tRNA sa strane suprotne varijabilnoj omči tRNA te međudjeluju s njom preko malog utora akceptorske ruke. aaRS razreda II vežu tRNA sa strane varijabilne omče preko velikog utora akceptorske ruke. Svaki od razreda aaRS je dodatno podijeljen u tri podrazreda, koji teže prepoznavanju kemijski sličnih aminokiselina.¹¹

Aminoacil-tRNA-sintetaze su modularni enzimi, te su uz katalitičku, razvile i dodatne domene za međudjelovanje s raznim dijelovima molekule tRNA što im je omogućilo razvoj vrlo specifičnog prepoznavanja. Dodatno, neke aaRS su razvile i domene za popravak pogrešno aminoacilirane tRNA ili imaju uloge koje nisu vezane za aminoacilaciju. Također postoje i samostojeće domene/proteini homologni domenama za popravak pogreške aminoacilacije. Tako je nađeno da homolog domene za popravak pogreške kod AlaRS, nazvan AlaXp može hidrolizirati Ser-tRNA^{Ala}.¹² Protein ThrXp je homolog domene za popravak pogreške kod ThrRS koji hidrolizira Ser-tRNA^{Thr}.¹³ ProRS ima čak dva različita

samopostojeća homologa domene za popravak pogreške, Ybak za hidrolizu Cys-tRNA^{Pro}, te ProX koji vrši katalizu hidrolitičkog cijepanja Ala-tRNA^{Pro}.^{14,15}

2.3 Raznolikost aminoacil-tRNA-sintetaza

Rana pojava aaRS u evoluciji je omogućila razvoj dodatnih domena i insercija koje su im pružile ne samo svojstvo visoke specifičnosti prema njihovim supstratima, već i mogućnost obavljanja novih funkcija koje nisu direktno povezane sa sintezom proteina.³ Pokazano je da neke aaRS sudjeluju u staničnoj apoptozi, sintezi rRNA te transportu RNA.^{16,17} Čini se da je broj dodanih domena veći kod kompleksnijih organizama, te se može zaključiti kako je dodavanje domena aminoacil-tRNA-sintetazama progresivan događaj u evoluciji.^{18,19} Sekvencioniranje genoma iz dana u dan sve većeg broja vrsta omogućilo je identifikaciju brojnih homologa i paraloga aminoacil-tRNA-sintetaza, bilo čitavih enzima ili njihovih pojedinih domena, čija je funkcija za većinu još uvijek neutvrđena.

Kod nekih aaRS su nađeni homolozi identificirani kao izoenzimi, koji su zadržali funkciju aaRS, no time se dovodi u pitanje njihova funkcija i razlog evolucijskog opstanka. Pretpostavlja se da promjene u aktivnom mjestu takvih homologa nisu utjecale na specifičnost prema aminokiselini i tRNA, već su omogućile rezistenciju domaćina na prirodne inhibitore koji blokiraju aktivnost drugog izoenzima.²⁰⁻²²

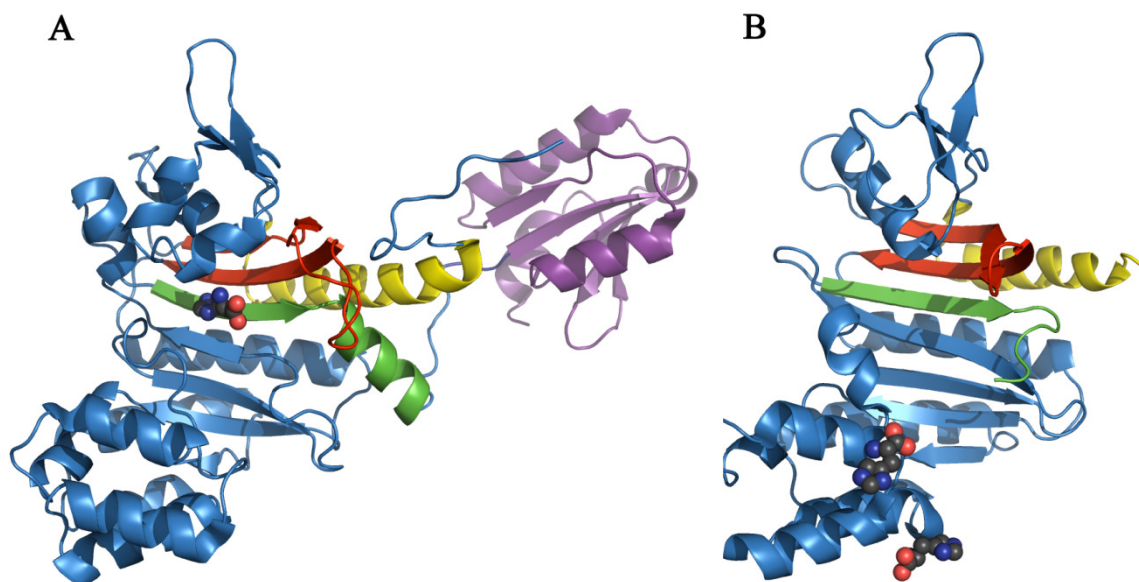
Za neke homologe aaRS je pokazano da umjesto pripadne vežu neku od nekanonskih aminokiselina. U nekim arhejama pirolizil-tRNA-sintetaza katalizira nastanak pirolizil-tRNA koja se koristi za translaciju nekih UAG stop kodona u pirolizin.²³ Neke metanogene arheje posjeduju fosfoseril-tRNA-sintetazu koja formira fosfoseril-tRNA^{Cys}, intermedijer u sintezi Cys-tRNA^{Cys}.²⁴

Brojni proteini određeni kao homolozi aaRS ili njihovih domena su poprimili funkciju posve različitu od one koju obavljaju aminoacil-tRNA-sintetaze. U sljedećim poglavljima ću spomenuti samo neke od njih za koje je barem donekle poznata funkcija koju obavljaju u organizmima u kojima su pronađeni.

2.4 Paralozi aminoacil-tRNA-sintetaza

2.4.1 HisZ - paralog histidil-tRNA-sintetaze

HisZ je porodica bakterijskih proteina čiji su geni prvi puta primijećeni u sklopu operona za biosintezu histidina u vrsti *Lactococcus lactis*. Iako sadrže sva tri motiva karakteristična za aaRS razreda II nedostaje im nekoliko aminokiselina esencijalnih za katalizu aminoacilacije.²⁵ Eksperimentima *in vitro* je pokazano kako HisZ nema sposobnost aktivacije aminokiseline histidina niti aminoacilacije tRNA^{His}.²⁶ Koristeći sojeve bakterija hisZ⁻ koji sadrže mutaciju koja onemogućuje ekspresiju HisZ proteina pokazano je da ti sojevi ne rastu u mediju bez prisustva aminokiseline histidina, na temelju čega je pretpostavljeno da HisZ sudjeluje u njegovoj biosintezi.²⁶ Utvrđeno je kako HisZ stupa u interakciju s *N*-1-(5'-fosforibozil)-ATP-transferazom (HisG), te je nužan za regulaciju njenog djelovanja. HisG katalizira reverzibilnu kondenzaciju ATP-a s 5'-fosforibozil- α -1-pirofosfatom (PRPP) pri čemu nastaje *N*-5'-fosforibozil-ATP (PR-ATP) koji je prvi međuprodukt u biosintezi histidina. Kristalna struktura HisZ u kompleksu s HisG je pokazala kako je HisZ zadržao osnove karakteristične strukture katalitičke domene aaRS razreda II, no kvaterna struktura i vezna mjesta histidina bitno su drugačiji (slika 2.2).



Slika 2.2. Usporedba podjedinice HisRS iz vrste *Thermus thermophilus* (A, PDB kod 1ADJ) i HisZ iz kompleksa s HisG proteinom (B, PDB kod 1USY).^{27,28} Motivi 1 (žuto), 2 (crveno) i 3 (zeleno) karakteristični za aaRS razreda II su očuvani kod HisZ, dok se mjesto vezanja histidina promijenilo. Supstrat histidin prikazan je u obliku kuglica. C-terminalna domena kod HisRS (ljubičasto) odgovorna za vezanje antikodona tRNA^{His} nije prisutna kod HisZ.

Kompleks HisG-HisZ se sastoji od 4 HisG i 4 HisZ podjedinice, pri čemu se 8 veznih mjesta za histidin nalazi na međupovršinama dvaju proteina. HisZ za razliku od HisRS nema C-terminalnu veznu domenu za antikodon, te njegova katalitička domena ima veliku šupljinu u obliku luka koja nije nađena kod HisRS.²⁸ Sličnosti u strukturi katalitičke domene HisRS i HisZ ukazuju na njihovo zajedničko porijeklo, te evolucijsku poveznicu biosinteze aminokiseline histidina i biosinteze proteina.²⁹

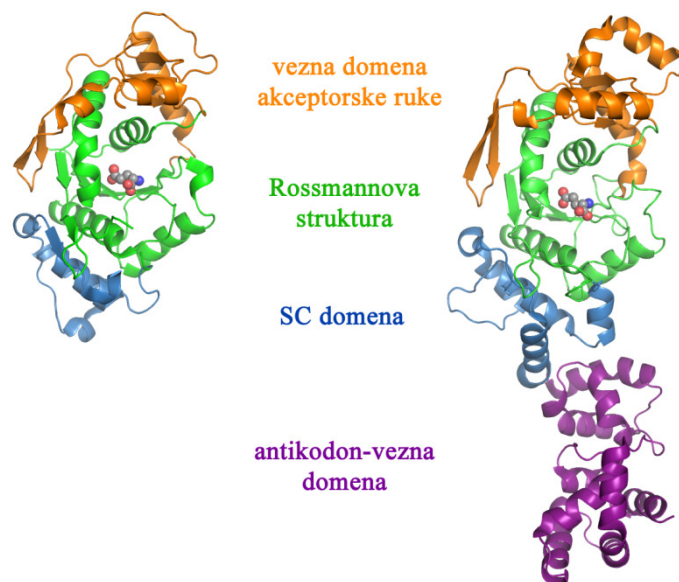
2.4.2 Paralog aspartil-tRNA-sintetaze sudjeluje u biosintezi asparagina

Analizom genoma arheja je nađeno da uz gen za asparagil-tRNA-sintetazu (AsnRS) posjeduju i otvoreni okvir čitanja za drugu AsnRS2 kojoj nedostaje antikodon-vezna domena. AsnRS2 iz hipertermofilne arheje *Pyrococcus abyssi* ne može aminoacilirati tRNA^{Asn}, već umjesto toga prevodi asparaginsku kiselinu u asparagin.³⁰ Uz to, AsnRS2 je homolog asparagin-sintetaze A (AsnA), enzima koji u bakterijama sudjeluje u amonijak-ovisnoj biosintezi asparagina.^{30,31} AsnRS2 aktivira asparaginsku kiselinu u prisustvu ATP-a, dok asparagin djeluje kao kompetitivni inhibitor. U prisustvu amonijevog klorida, aspartata i ATP-a AsnRS2 katalizira stvaranje asparagina kojim AsnRS može aminoacilirati tRNA^{Asn}.³⁰ Ovakav način biosinteze asparagina pomoću homologa AsnA koji ima očuvanu katalitičku domenu aaRS razreda II nađen je samo u rodovima *Pyrococcus*, *Thermoplasma* i *Pyrobaculum*, dok ostale arheje koriste indirektne puteve za sintezu tRNA^{Asn} transamidacijom aspartil-tRNA^{Asn}.³² Jedan od mogućih razloga zašto se u prirodi razvilo više puteva biosinteze asparagina jesu različiti životni uvjeti organizama, tj. mogućnost odabira različitih izvora dušika.³²

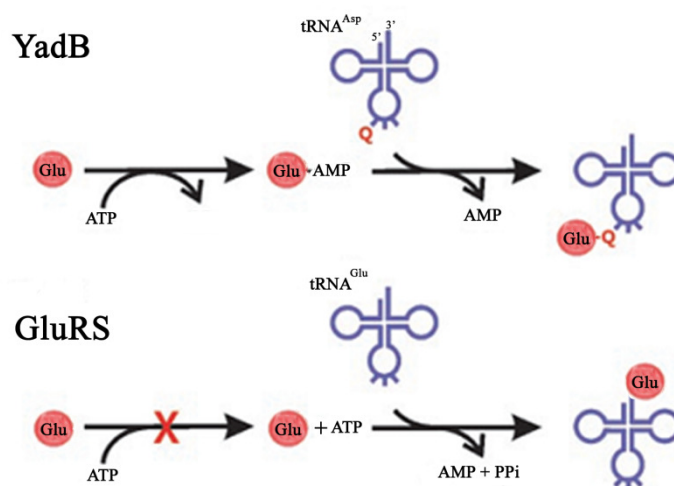
2.4.3 YadB – paralog GluRS koji veže Glu na antikodon tRNA^{Asp}

U sklopu programa strukturne genomike koji teži rješavanju struktura svih proteina bakterije *Escherichia coli* za koje postoji otvoreni okvir čitanja, riješena je trodimenzijska struktura proteina nazvanog YadB.³³ Analizom sekvence i strukture je nađeno da YadB nalikuje katalitičkoj domeni glutamil-tRNA-sintetaze (GluRS), te da mu kao i u slučaju HisZ nedostaje vezna domena za antikodon (slika 2.3). No, za razliku od HisZ, ovaj paralog ima očuvane aminokiseline bitne za vezanje glutaminske kiseline i ATP-a, te je zadržao dio funkcije svojstvene aaRS. Kao i GluRS, YadB aktivira glutaminsku kiselinu pomoću ATP-a u glutamil-adenilat.³⁴ No, dok GluRS prenosi aktiviranu aminokiselinu na 3'-adenozin tRNA^{Glu}, YadB prenosi Glu na modificirani nukleotid kvenozin 34 (Q) koji se nalazi na prvom mjestu

antikodona tRNA^{Asp} (slika 2.4).³⁴ Obzirom na novu vrstu reakcije koju katalizira, YadB je preimenovan u glutamil-kvenozin-tRNA^{Asp}-sintetazu (Glu-Q-RS).^{34,35} Zanimljivo je da iako GluRS za aktivaciju aminokiseline zahtijeva prisutnost tRNA^{Glu}, YadB može aktivirati Glu bez prisustva molekule tRNA (slika 2.4).³⁶



Slika 2.3. Usporedba struktura YadB proteina (lijevo, PDB kod 4A91) iz *E. coli* i GluRS iz *T. thermophilus* (desno, PDB kod 2CUZ).^{37,38} Bojama su označene pojedine domene. Supstrat glutaminska kiselina je prikazana u obliku kuglica.



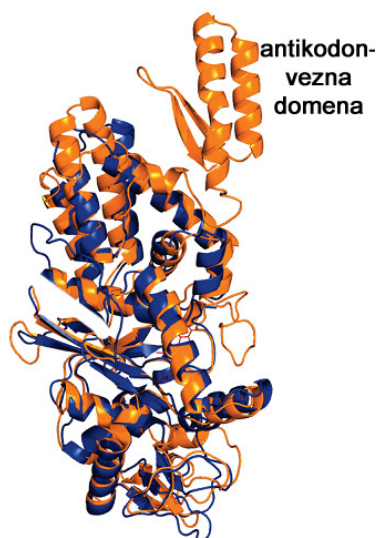
Slika 2.4. Način vezanja glutaminske kiseline na tRNA kod GluRS i njegovog paraloga YadB. Slika je preuzeta iz M. Ibba i C. Francklyn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) 7493-7494.

Kao i GluRS iz vrsta *E. coli* i *B. subtilis*, YadB također posjeduje cinkov ion u aktivnom mjestu, koordiniran s tri cisteina i tirozinom.³³ Kod *E. coli* GluRS Zn²⁺ je koordiniran s tri cisteina i histidinom. Smješten je u domeni za vezanje akceptorske ruke tRNA, i esencijalan je za katalizu aminoacilacije. Još su uvijek neriješena pitanja kako se

antikodonski dio tRNA^{Asp} veže na YadB i u aktivno mjesto, te što je krajnja funkcija tako hipermodificirane tRNA.

2.4.4 MshC sudjeluje u biosintezi mikotiola

MshC je paralog cisteinil-tRNA-sintetaze (CysRS) koji katalizira ATP-ovisno vezanje cisteina na amino-skupinu 1-D-mio-inozitol-2-amido-2-deoksi-*R*-D-glukopiranozida (GlcN-Ins), prekursora u predzadnjem koraku biosinteze mikotiola. Mikotiol proizvode bakterije aktinomicete, a služi kao zaštita od oksidativnog stresa i protiv nekih otrova. Riješena trodimenzijska struktura MshC iz vrste *Mycobacterium tuberculosis* je pokazala visoku sličnost s CysRS (slika 2.5) i očuvanom Rosmannovom strukturom.⁴⁰ Kao i kod CysRS, uočena je prisutnost cinkovog iona, te predložena njegova uloga u aktivaciji i prepoznavanju cisteina.⁴⁰

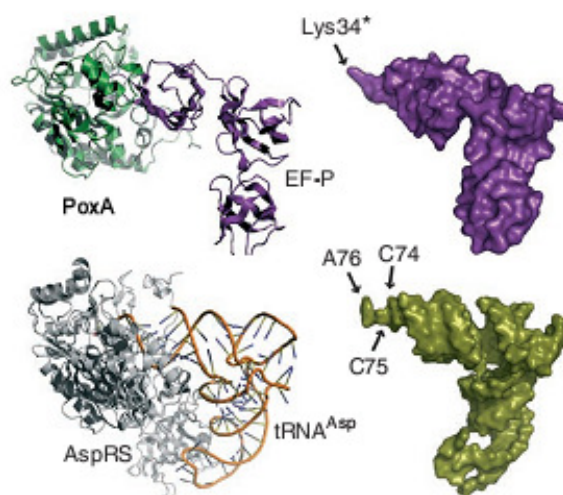


Slika 2.5 Preklopljene strukture MshC (plavo, PDB kod 3C8Z) i CysRS (narančasto, PDB kod 1UOB). MshC nema antikodon-veznu domenu. Slika preuzeta iz L. W. Tremblay i sur., *Biochemistry* **47** (2008) 13326-13335.

2.4.5 PoxA veže elongacijski faktor P

PoxA, paralog lizil-tRNA-sintetaze (LysRS) kojem nedostaje N-terminalna antikodon-vezna domena, umjesto na tRNA prenosi aminokiselinu lizin na ϵ -amino skupinu konzerviranog lizina elongacijskog faktora P (EF-P). EF-P je protein koji svojim oblikom i veličinom nalikuje L-obliku molekule tRNA, pri čemu i mjesto lizina odgovara 3'-kraju tRNA (slika 2.6). Na pojačanu aktivnost PoxA utječe YjeK (paralog lizin-2,3-aminomutaze) čiji je gen nađen u blizini gena za EF-P, te se pretpostavlja da sudjeluje u prevođenju nastalog α -

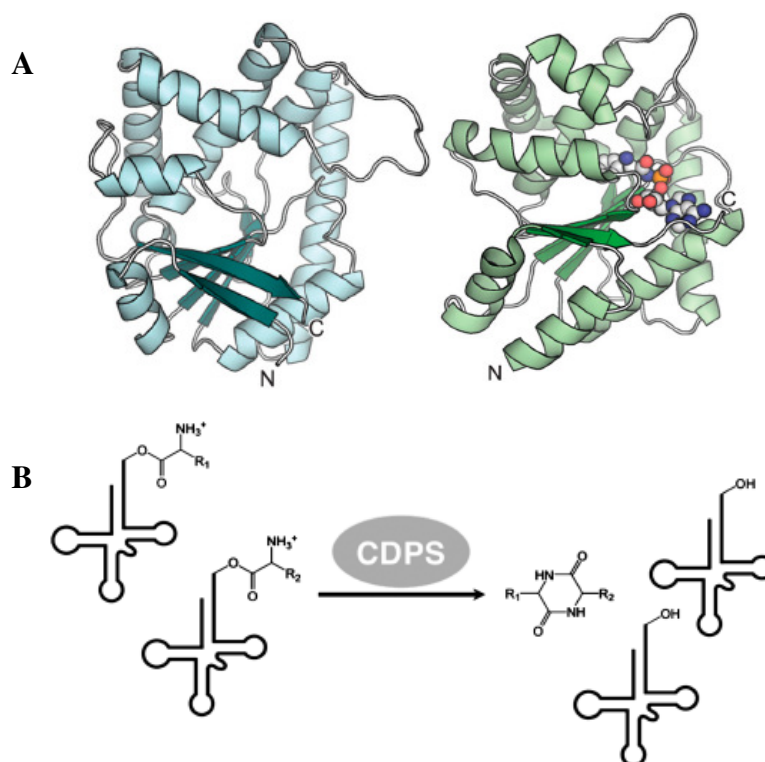
lizil-EF-P u β -lizil-EF-P.⁴¹ EF-P se veže između peptidil-tRNA-veznog mjesta (P mjesta) i izlaznog tRNA E mjesta ribosoma te stabilizira vezanje *N*-formilmetionil-tRNA, stimulirajući ribosomsku aktivnost prijenosa peptida. Ova posttranslacijska modifikacija je potrebna za virulentnost bakterija *Salmonella typhimurium* i *Agrobacterium tumefaciens*⁴², te je pokazano da mutant *E. coli* s deletiranim genom za PoxA nije vijabilan.⁴³ Strukturne analize su pokazale da PoxA-EF-P kompleks nalikuje kompleksu AspRS-tRNA^{Asp} (slika 2.6).^{41,42}



Slika 2.6. Usporedba struktura kompleksa PoxA-EF-P i AspRS-tRNA^{Asp}. Protein EF-P strukturno nalikuje tRNA pri čemu je Lys34 koji prolazi postranslacijsku modifikaciju na poziciji analognoj 3'-kraju tRNA. Prilagođeno i preuzeto iz T. Yanagisawa i sur., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17** (2010) 1136-1143.

2.4.6 Ciklodipeptid-sintaze su strukturni homolozi aaRS podrazreda Ic

Porodica enzima ciklodipeptid-sintaze (CDPS) proizvodi sekundarne metabolite ciklodipeptide. Unatoč vrlo niskoj sličnosti na razini sekvence (15% i manje), strukturno nalikuju katalitičkim domenama aaRS podrazreda Ic⁴⁴ (slika 2.7). Zanimljivo je da ovi proteini nemaju mogućnost aktivacije aminokiseline, već koriste aminoaciliranu tRNA u reakciji sinteze ciklodipeptida. Tako na primjer, *M. tuberculosis* Rv2275 u odnosu na aaRS Ic nema ATP-vezno mjesto niti antikodon-veznu domenu. On prenosi tirozin s Tyr-tRNA^{Tyr} na serin u aktivnom mjestu (Ser88) reakcijom transesterifikacije, pri čemu nastaje kovalentno vezani intermedijer.⁴⁵



Slika 2.7. **A** Strukture ciklodipeptid-sintaze YvmC-Blic iz *Bacillus licheniformis* (lijevo, PDB kod 3OQH)) i katalitičke domene TyrRS iz kvasca (PDB kod 2DLC).⁴⁴ **B** Shema reakcije koju kataliziraju CDPS. Slika preuzeta iz L. Bonnefond i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108** (2011) 3912-3917.

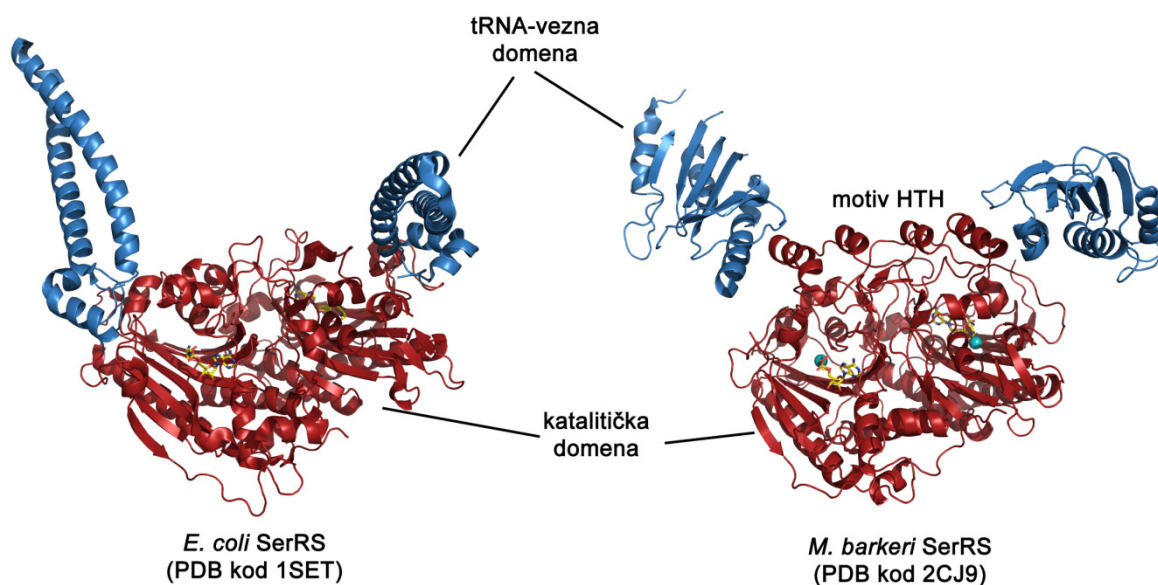
Iz svih navedenih primjera se može zaključiti da aminoacil-tRNA-sintetaze i njima slični proteini nisu samo pasivni sudionici u proizvodnji proteina i čuvari točnosti procesa translacije, već su se svojim dodatnim funkcijama proželi kroz mnogobrojne procese u stanici. Mnogi primjeri otkriveni proučavanjem dodatnih funkcija aaRS pokazali su da bi one mogle biti jedni od ključnih proteina u staničnoj regulaciji, kao što je kontrola staničnog ciklusa, diferencijacija tkiva, stanična kemotaksija i upalni procesi.⁴⁶

2.5 Seril-tRNA-sintetaze

Seril-tRNA-sintetaze (SerRS) pripadaju aminoacil-tRNA-sintetazama razreda IIa. One kataliziraju aktivaciju serina pomoću ATP-a pri čemu nastaje seril-adenilat s kojeg se zatim serin prenosi na izoakceptorsku tRNA^{Ser}. Prva riješena struktura SerRS iz vrste *E. coli* otkrila je novi način vezanja nukleotida karakterističan za aaRS razreda II.⁴⁷

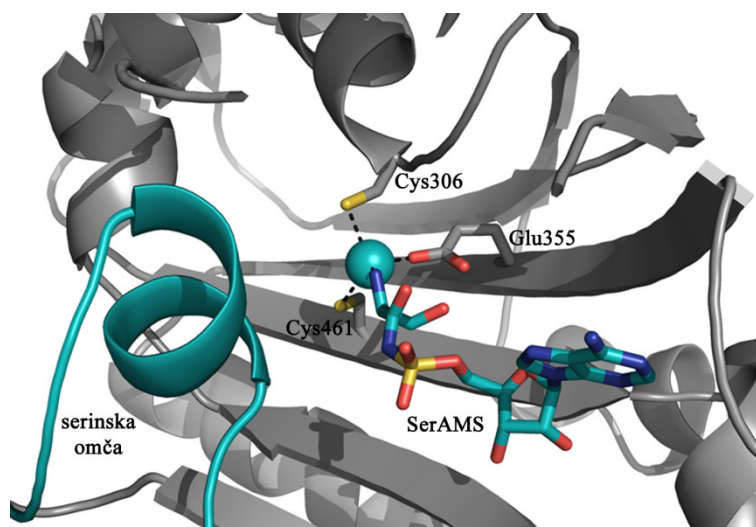
Usporedbom sekvenci i filogenetskom analizom SerRS iz većine do sada poznatih genoma utvrđeno je postojanje dva evolucijski različita tipa enzima: bakterijski tip, prisutan u bakterijama, eukariotima i većini arheja, i metanogeni tip prisutan u gotovo svim metanogenim arhejama (mSerRS).⁴⁸ Kod svih do sada određenih struktura SerRS utvrđeno je

da se radi o homodimeru. Usporedbom kristalnih struktura dva tipa SerRS (SerRS iz *E. coli* i SerRS iz *Methanosarcina barkeri* (mMbSerRS)) je nađeno da su oba homodimeri, pri čemu se svaki monomer sastoji od dvije domene, katalitičke i N-terminalne tRNA-vezne domene (slika 2.8).^{7,47} Struktura katalitičkih domena oba tipa SerRS, te motivi 1, 2 i 3 karakteristični za aaRS razreda II su očuvani. Struktura seril-tRNA-sintetaze metanogene arheje *M. barkeri* posjeduje jedinstvenu, 30 aminokiselina dugu inserciju unutar katalitičke domene. Ona tvori strukturni motiv zavojnica-okret-zavojnica (eng. *helix-turn-helix*, HTH). Unutar dimera seril-tRNA-sintetaze, motiv HTH jednog monomera stvara interakcije s katalitičkom i tRNA-veznom domenom drugog monomera (slika 2.8). Pokazano je da motiv HTH ima ulogu u dimerizaciji enzima, te pozicioniranju tRNA-vezne domene u pravilnu orijentaciju za vezanje tRNA.⁴⁹



Slika 2.8. Usporedba trodimenzijskih struktura *E. coli* SerRS (bakterijski tip) i *M. barkeri* SerRS (metanogeni tip).

Za razliku od bakterijskog tipa, u aktivnom mjestu mSerRS se nalazi ion cinka koordiniran s tri sačuvane aminokiseline (Cys306, Glu355 i Cys461) i molekulom vode koju vezanjem u aktivno mjesto zamjenjuje amino-skupina supstrata serina.⁷ Vezanjem serina dolazi do formiranja tzv. „serinske omče“ čime se zatvara dio aktivnog mjesta i pravilno smješta serin za reakciju (slika 2.9). SerRS su jedina do sada poznata skupina sintetaza koja je razvila dva različita mehanizma prepoznavanja aminokiseline.

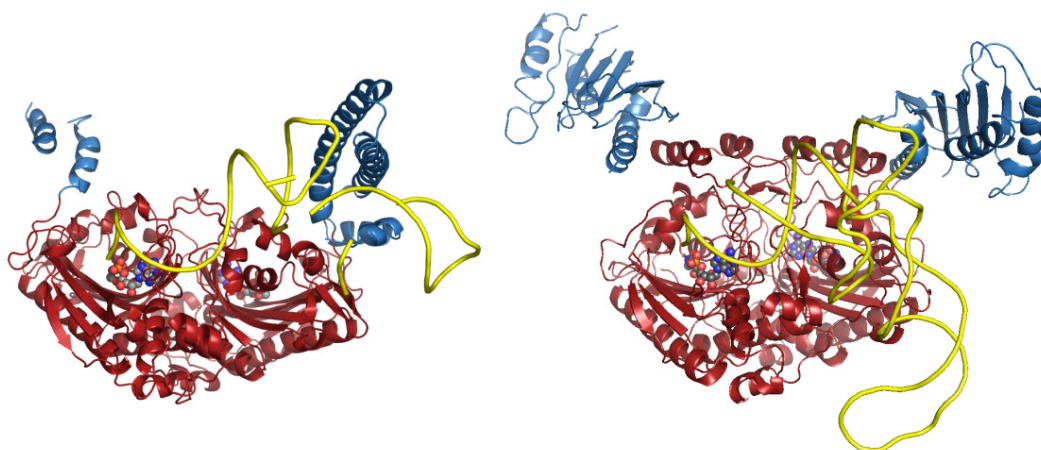


Slika 2.9. Aktivno mjesto mMbSerRS s analogom seril-adenilata (SerAMS), PDB kod 2CJ9.⁷ Aminokiseline uključene u vezanje SerAMS-a prikazane su kao štapići, dok je Zn^{2+} zelena kuglica. Zeleno je obojana „serinska omča“.

Metanogeni tip SerRS ima znatno veću tRNA-veznu domenu građenu od antiparalelne β -ploče okružene s četiri α -zavojnice, dok kod bakterijskog tipa ovu domenu čine samo dvije, oko 60 Å duge antiparalelne α -zavojnice (slika 2.8).

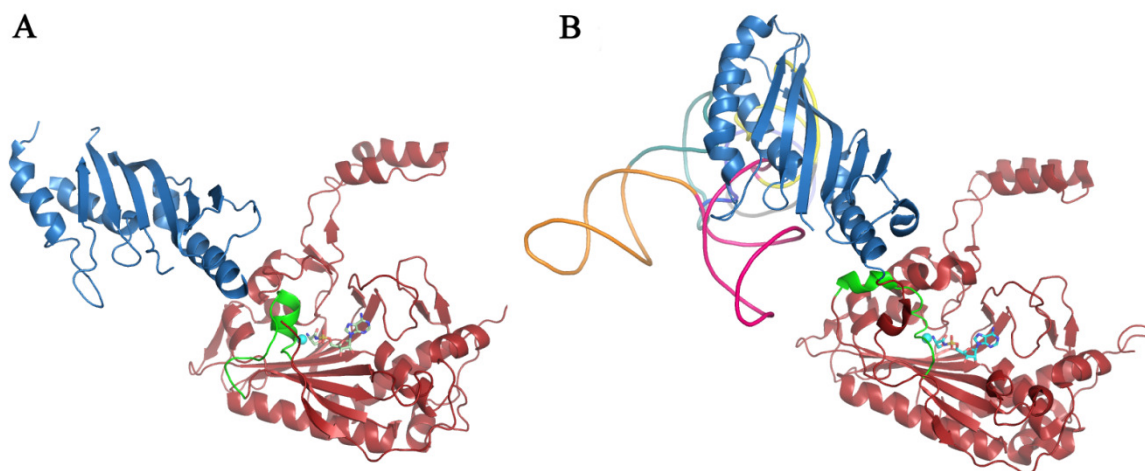
Struktura bakterijskog tipa SerRS u kompleksu s tRNA^{Ser} je otkrila da se jedna molekula tRNA veže preko obje podjedinice homodimera enzima (slika 2.10).⁵⁰ Omča motiva 2 stvara interakcije s velikim utorom akceptorske ruke pri čemu prolazi stukturane promjene (T konformacija) u odnosu na drugu podjedinicu bez tRNA i s analogom seril-adenilata u aktivnom mjestu (A konformacija).⁵⁰

Koristeći strukture mMbSerRS, *T. thermophilus* SerRS- tRNA^{Ser} i tRNA^{Tyr} , predložen je model kompleksa metanogenog tipa SerRS i tRNA (slika 2.10).⁷ Prema modelu, jedna molekula tRNA se veže na obje podjedinice mMbSerRS, pri čemu duga varijabilna ruka ostvaruje interakcije s konzerviranim α -zavojnicama H1 i H2 N-terminalne tRNA-vezne domene. Pretpostavlja se da je tRNA-vezna domena povezana s katalitičkom domenom samo preko fleksibilne omče vrlo mobilna, te može mijenjati položaj ovisno o prisustvu tRNA.



Slika 2.10. Usporedba kristalne strukture kompleksa SerRS bakterijskog tipa s tRNA (lijevo) i modela kompleksa mMbSerRS s tRNA (desno). Katalitičke domene obojane su crveno, tRNA-vezne domene plavo, molekule tRNA žuto. Analog seril-adenilata u aktivnom mjestu prikazan je pomoću kuglica.

Nedavno je riješena kristalna struktura SerRS metanogenog tipa iz vrste *Methanopyrus kandleri* (mMkSerRS) u kompleksu s tRNA^{Sec} iz vrste *Aquifex aeolicus* koja nosi antikodon za aminokiselinu selenocistein (Sec) s analogom seril-adenilata u aktivnom mjestu (PDB kod 3W3S, slika 2.11). Katalitička domena mMkSerRS gotovo je identična katalitičkoj domeni mMbSerRS, te također sadrži ion cinka u aktivnom mjestu koordiniran s dva cisteina i glutamatom. Analog seril-adenilata je vezan u aktivno mjesto na isti način kao i kod mMbSerRS. Motiv HTH karakterističan za metanogene SerRS je također očuvan kod mMkSerRS. N-terminalna tRNA-vezna domena strukturno je identična onoj nađenoj kod mMbSerRS, ali je u kompleksu s tRNA čitava domena zarotirana i pomaknuta bliže prema motivu HTH. U kompleksu su nađene dvije molekule tRNA, od kojih je svaka vezana na N-terminalnu domenu. Pri tome je najviše interakcija ostvareno preko varijabilne ruke tRNA^{Sec}. Niti jedna od molekula tRNA nema 3'-kraj smješten u blizini aktivnog mjesta, što ukazuje na neproduktivan način vezanja. Unatoč tome, zanimljivo je da je najveća razlika između dviju SerRS metanogenog tipa u području „serinske omče“ za koju se pretpostavlja da sterički smeta vezanje tRNA, te se mora odmaknuti prilikom vezanja. Kod mMkSerRS u kompleksu s tRNA „serinska omča“ je pomaknuta nešto dalje od aktivnog mjesta prema N-terminalnoj domeni (slika 2.11).



Slika 2.11. Usporedba podjedinica mMbSerRS (A) i mMkSerRS u kompleksu s tRNA^{Sec} (B, PDB kod 3W3S). Katalitička domena prikazana je crvenom, N-terminalna domena plavom, a „serinska omča“ zelenom bojom. Ion cinka i analog seril-adenilata u aktivnom mjestu prikazani su svijetlo plavom bojom. Antikodonska omča tRNA prikazana je narančastom, a varijabilna ruka ružičastom bojom.

2.6 Proteini slični seril-tRNA-sintetazama

Paralog seril-tRNA-sintetaze nazvan SLIMP (eng. *seryl-tRNA synthetase-like insect mitochondrial protein*) je nađen u nekoliko beskralješnjaka i svim do sada poznatim genomima kukaca. Lokaliziran u mitohondrijima, izgubio je mogućnost vezanja i aktivacije aminokiseline dok je zadržao mogućnost vezanja tRNA. Pretpostavlja se da je SLIMP nastao kao posljedica duplikacije gena za mitohondrijsku SerRS. Šest od 11 inače konzerviranih aminokiselina aktivnog mjesta kanonskih mitohondrijskih SerRS, bitnih za pravilno vezanje serina i ATP-a, kod SLIMP-a nije očuvano. Ovaj paralog posjeduje signalni peptid (30 aminokiselina) na N-kraju pomoću kojeg se translocira u mitohondrij. Inaktivacijom gena za SLIMP nastaju morfološke promjene u mitohondrijima koje se mogu ispraviti dodatkom anti-oksidativnih molekula što ukazuje na moguću ulogu SLIMP-a u oksidativnom stresu.⁵¹

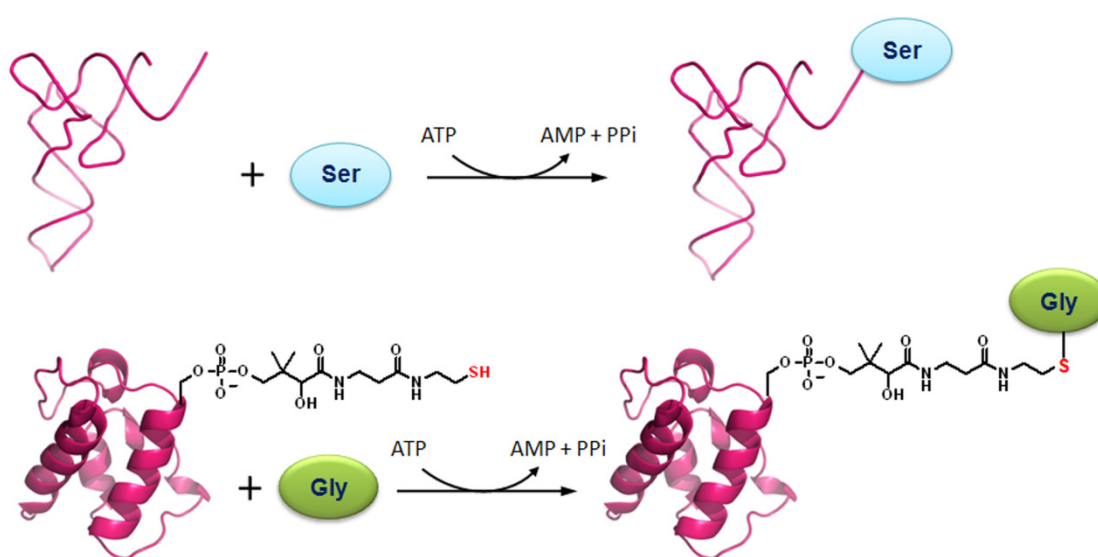
Humana SerRS sadrži dodatnu UNE-S domenu na svom C-kraju koja je svojstvena samo vrstama s razvijenim zatvorenim krvožilnim sustavom. UNE-S domena nosi nuklearni lokalizacijski signal koji usmjerava SerRS u jezgru gdje smanjuje ekspresiju krvožilnog endotelnog faktora rasta A, pri čemu je njena uloga u krvožilnom razvoju neovisna o aminoacilacijskoj funkciji.⁵² Pretpostavlja se da je pojava UNE-S domene tijekom evolucije povezana s nastankom zatvorenog krvotoka kod kralješnjaka.⁵²

Biotin-sintetaza/represor protein (BirA) ima dvije funkcije. Djeluje kao biotin-protein-ligaza vežući prostetičku skupinu biotin na lizin biotin-protein-nosača. Druga funkcija BirA je

regulacija njegove vlastite transkripcije vezanjem na određeni slijed nukleotida molekule DNA, pri čemu koristi biotin kao ko-represor. Struktura BirA je pokazala da se sastoji od male N-terminalne domene građene kao motiv HTH pomoću kojeg se veže na DNA, veće biotin-vezne domene i C-terminalne domene koja nalikuje SH2 domeni karakterističnoj za proteine koji sudjeluju u prijenosu signala u stanici.⁵³ Biotin-vezna domena strukturno nalikuje katalitičkoj domeni SerRS iako između njih nije nađena značajna sekvencijska sličnost.⁵⁴

2.7 Aminokiselina:[protein-nosač]-ligaze

Detaljnim analizama sekvencioniranih bakterijskih genoma su nađeni otvoreni okviri čitanja za krnje homologe SerRS metanogenog tipa kojima nedostaje domena za vezanje tRNA. Nekoliko predstavnika homologa je biokemijski okarakterizirano pri čemu je potvrđeno da nemaju sposobnost vezanja molekule tRNA.⁸ Također je uočena promijenjena i relaksirana specifičnost prema aminokiselini. Naime, ovi enzimi ne aktiviraju ATP-om serin, već glicin ili alanin. Tražeći molekulu na koju se aktivirana aminokiselina prenosi, u blizini gena za homologe mSerRS primijećeni su geni protein-nosača koji imaju vezno mjesto za 4'-fosfopantetein. Pokazano je da homolozi mSerRS prenose aktiviranu aminokiselinu na tiolnu skupinu 4'-fosfopanteteina odgovarajućeg protein-nosača (slika 2.12). Obzirom da su promijenili specifičnost prema oba supstrata i da kataliziraju reakciju tioesterifikacije, nazvani su aminokiselina:[protein-nosač]-ligazama.⁸



Slika 2.12. Usporedba kemijskih reakcija koje kataliziraju SerRS (gornja shema) i njihovi paralozi, Gly:CP-ligaze (donja shema).

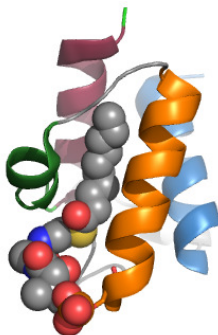
Sačuvana adenilacijska aktivnost, te sposobnost vezanja aktivirane aminokiseline na protein-nosač je kemijska reakcija koju obavljaju strukturno i evolucijski različite adenilacijske domene neribosomskih peptidil-sintetaza. Sličnost u obavljanju funkcije ukazuje na mogućnost da ova skupina enzima predstavlja poveznicu između ribosomske i neribosomske sinteze proteina. Zanimljivo je da su nađene aminoacilirane tRNA^{Ser} koje se koriste u biosintezi antibiotika.⁵⁵

2.8 Adenilat-formirajući enzimi

Svi adenilat-formirajući enzimi kataliziraju aktivaciju karboksilatnih supstrata pomoću ATP-a pri čemu se oslobađa pirofosfat. Nastali karboksilatni adenilat je vrlo reaktivan te isti enzimi kataliziraju i drugi korak reakcije, u kojem nukleofil (amino, alkoholna ili tiolna skupina) reagira s nastalim intermedijerom pri čemu nastaju konačni produkt i AMP.⁹ Prema navedenom, može se smatrati da su i aminoacil-tRNA-sintetaze i aminokiselina:[protein-nosač]-ligaze pripadnici ove velike skupine proteina. Nedavno je predložena nova podjela adenilat-formirajućih enzima u tri velika razreda.⁹ Razred I sastoji se od tri skupine enzima: neribosomske peptid-sintetaze (NRPS), acil- ili aril-CoA-sintetaze i luciferazne oksidoreduktaze. Drugi razred čine već spomenute aaRS, dok su treći razred NRPS neovisne sintetaze siderofora podijeljene u četiri skupine. Članovi prvog velikog razreda adenilat-formirajućih enzima imaju veliku N-terminalnu domenu koja je fleksibilnom omčom povezana s manjom C-terminalnom domenom. Međusobna orijentacija domena se razlikuje među članovima skupine, ali do pokretanja čitavih domena dolazi i prilikom pripreme aktivnog mjesta za obavljanje prvog ili drugog koraka reakcije. ATP vezno mjesto se nalazi na dodirnoj površini domena, i najčešće je građeno poput Rosmannove strukture. Pripadnici trećeg velikog razreda su građeni od tri domene, te kao i aaRS razreda II nemaju Rosmannovu strukturu za vezanje ATP-a. Umjesto toga, tri domene na svojoj dodirnoj površini tvore duboku šupljinu u sredini enzima, čiji su dijelovi nalik na veznu strukturu cAPK-a za nukleotid-trifosfat.⁹ Svi adenilat-formirajući enzimi kataliziraju sličnu vrstu reakcije ali unatoč tome su izuzetno raznoliki obzirom na strukturu i porijeklo. U vrsti *Mycobacterium tuberculosis* je nađeno preko 60 adenilacijskih enzima, od kojih mnogi predstavljaju potencijalne farmakološke mete zbog esencijalnosti ili potvrđene uloge u procesu virulencije.⁵⁶

2.9 Raznolike uloge protein-nosača

Protein-nosači su brojna skupina proteina koji obično sadrže 70-100 aminokiselina te djeluju kao samostalni monomerni proteini ili kao domene u sklopu golemih multifunkcionalnih proteinskih kompleksa.⁵⁷ Svojom ulogom su uključeni u brojne i raznolike primarne i sekundarne metaboličke putove. Protein-nosači unatoč maloj veličini i fleksibilnoj prirodi imaju konzerviranu strukturu. Građeni su od 3-4 α -zavojnice koje tvore oblik klupka te posjeduju konzervirani serin na početku α -zavojnice II (slika 2.13), koji prolazi posttranslacijsku modifikaciju kovalentnog vezanja duge prostetičke skupine 4'-fosfopanteteina (Ppant).⁵⁷ Enzim 4'-fosfopanteteinil-transferaza (PPT-aza) prevodi apo-CP u holo-oblik prenoseći 4'-fosfopanteteinski dio s koenzima A (CoA) na bočni ogranak serina.⁵⁷ 4'-fosfopanteteinska skupina se pokazala kao pogodna ruka na čiju se slobodnu tiolnu skupinu mogu kovalentno vezati različite kemijske skupine u obliku aktiviranih tioestera. Pri tome protein-nosač na svojoj površini posjeduje informaciju nužnu za odabir pravog proteina partnera od kojeg uzima ili kojem predaje željenu kemijsku skupinu potrebnu za sintezu konačnog produkta. Mnoge vrste u svojim genomima sadrže više kopija gena za različite protein-nosače koji unatoč sličnoj strukturi obavljaju vrlo raznolike funkcije, od kojih su mnoge još nepoznate. Tako je na primjer, u vrsti *Streptomyces avermitilis* nađeno da genom sadrži preko 85 kopija gena za protein-nosače.⁵⁸



Slika 2.13. Struktura dekanoil-protein-nosača (dekanoil-ACP) iz *E. coli* (PDB kod 2FAE), građena od četiri α -zavojnice (I – plavo, II – narančasto, III – zeleno i IV – ljubičasto obojena).⁵⁹ Kuglicama su prikazani dekanoilni lanac i fosfopanteteinska skupina na koju je tioesterski vezan. Prikazani ACP (eng. *acyl carrier protein*) nositelj je aktiviranih međuprodukata tijekom biosinteze masnih kiselina.

Protein-nosači su najpoznatiji po svojoj ulozi u biosintezi masnih kiselina gdje acil-protein-nosači (ACP) kao esencijalni kofaktori služe za prijenos acilnih intermedijera pri čemu stupaju u interakciju s 12 ili više različitih proteina.⁵⁸ Kod eukariota su ACP-ovi uglavnom domene unutar golemih multifunkcionalnih sintaza masnih kiselina (FAS sustav tip I, eng. *fatty acid synthase*) veličine do 1.8 MDa. U prokariotima, mitohondrijima i plastidima ACP-ovi djeluju kao samostalni mali proteini u sklopu FAS sustava tipa II u kojem je svaka

jedinica sustava zaseban polipeptidni lanac, koji međudjeluje s ACP-om *in trans* tijekom elongacijskog ciklusa.⁵⁸ FAS sustav tipa I je nađen i u nekim bakterijama, poput vrste *Mycobacterium tuberculosis* gdje proizvodi masne kiseline C12-C16, koje se zatim na FAS sustavu tipa II produljuju u duge masne kiseline (C50-C60) bitne za stvaranje mikolnih kiselina koje su dominantna lipidna sastavnica stanične ovojnice. Za ACP iz *E. coli* je nađeno da međudjeluje s preko 30 različitih proteina, što ga čini jednim od najpromiskuitetnijih proteina u toj vrsti.⁵⁸ Kod *E. coli* gotov acilni produkt, još uvijek vezan na ACP (acil-ACP), sudjeluje dalje u sintezi glicerofosfolipida, glavne sastavnice plazma membrane i unutrašnje strane vanjske membrane Gram-negativnih bakterija. Općenito, bakterijski acil-ACP intermedijeri ostvaruju interakcije s mnogo većim brojem enzima nego eukariotski, te sudjeluju u biosintezi širokog spektra masnih kiselina i njihovih derivata. Kod Gram-negativnih bakterija veliki dio sintetiziranih masnih kiselina završi kao dio endotoksičnog lipida A, koji je komponenta lipopolisaharida na vanjskoj strani membrane, esencijalnog za rast bakterije i integritet membrane. *N*-acilhomoserin-lakton-sintaze (AHL-sintaze) također koriste acil-ACP; kataliziraju njegov nukleofilni napad na *S*-adenozil-metionin te laktonizaciju metioninskog dijela pri čemu nastaju *N*-acilhomoserin-laktone bitni u stvaranju bakterijskog biofilma i komunikaciji među bakterijama.⁶⁰ Acil-protein-nosači su uključeni i u acilaciju bakterijskih toksina kao što je hemolizin, jedan od najproučavanijih toksina koji stvaraju pore u membranama stanica koje napadaju.

ACP-e koriste i neki enzimi citokromi P450, dio velike porodice oksidativnih hemoproteina koji sudjeluju u biosintezi antibiotika. Kristalna struktura P450 izoliranog iz biotinskog operona vrste *Bacillus subtilis* (P450_{BioI}) u kompleksu s *E. coli* ACP-om je pokazala da se lanac masne kiseline veže u hidrofobno aktivno mjesto pri čemu poprima svijenu U-konformaciju.⁶¹ Većina interakcija između proteina uključuje ionske mostove između kiselih aminokiselina ACP-a i bazičnih aminokiselina P450_{BioI}. Vezanjem ACP-a na P450_{BioI} nisu primijećene značajne strukturne promjene između apo- i holo-ACP-a, te ACP-a u kompleksu s P450_{BioI}. Također je pokazano da niti apo-ACP niti holo-ACP bez acilnog dijela vezanog na 4'-fosfopantetein ne stupaju u interakciju s P450_{BioI}.⁶¹

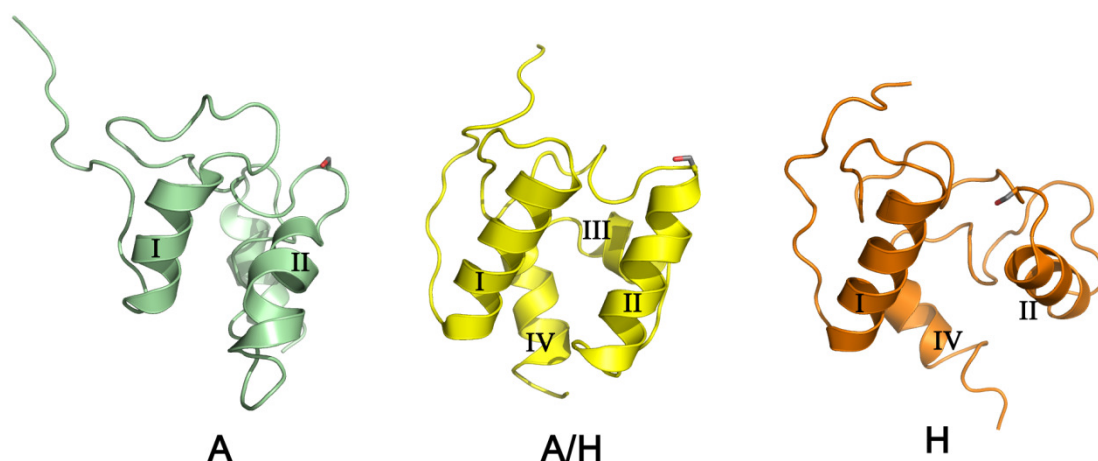
Do sada su riješene brojne strukture apo- i holo-oblika ACP-a, od kojih najveći broj pomoću NMR-a zbog njihove vrlo fleksibilne prirode i male molekulske mase. Riješene kristalne strukture *E. coli* ACP-a na čiju su prostetičku skupinu vezani acilni lanci različitih duljina (C6, C7 i C10) su otkrile da se acilni lanac smješta unutar hidrofobne udubine ACP-a koja ima sposobnost proširenja ovisno o duljini acilnog lanca.⁵⁹ Na taj je način tioesterska

veza zaštićena od otapala, dok se između ACP-a i acilnog lanca ostvaruju nespecifične hidrofobne interakcije. Primijećeni su različiti načini vezanja tioestera na ACP čime se omogućuje optimalno vezanje pojedinih intermedijera na proteine partnere tijekom biosintetičkog ciklusa.

Protein-nosači su uključeni i u proizvodnju sekundarnih metabolita kao što su poliketidi i neribosomski peptidi.⁶² Poliketid-sintaze (PKS) sudjeluju u sintezi prirodnih poliketida, sekundarnih metabolita koji vrlo često imaju antimikrobna, antiparazitska ili antitumorska svojstva što ih čini farmakološki i industrijski vrlo privlačnima. Neki od najpoznatijih su antibiotik eritromicin A, imunosupresor rapamicin, te lovastatin koji ima antikolesterolska svojstva. Poliketid-sintaze su nađene u filamentoznim bakterijama tla i mora, te gljivama i višim biljkama. Način biosinteze poliketida podsjeća na biosintezu masnih kiselina, te analogno FAS sustavima, i kod PKS postoji tip I građen kao veliki multifunkcionalni protein i tip II koji uključuje pojedine manje proteine od kojih svaki obavlja neki od koraka u sintezi. Postoji i PKS tip III, ali pri tom načinu sinteze poliketida ne sudjeluju protein-nosači.⁵⁸

Neribosomske peptid-sintetaze (NRPS) su multifunkcionalni enzimi nađeni kod prokariota i nižih eukariota koji sintetiziraju biološki aktivne peptide kao što su antibiotici vankomicin i tirocidin, siderofor enterobaktin i imunosupresor ciklosporin.⁶² Minimalni modul NRPS se sastoji od kondenzacijske, adenilacijske i peptidil-protein-nosač (PCP) domene.⁶² Iako strukturno niti evolucijski nisu slične, adenilacijske domene aktiviraju aminokiselinu pomoću ATP-a u aminoacil-adenilat kao i aminoacil-tRNA-sintetaze. Aktivirana aminokiselina se zatim prenosi na 4'-fosfopanteteinsku ruku koju nosi peptidil-protein-nosač domena tvoreći tioester. Kondenzacijska domena katalizira stvaranje peptidne veze između međuprodukata vezanih na dva susjedna PCP-a. Na kraju NRPS-a obično postoji i tioesterazna TE domena koja hidrolitički oslobađa nastali produkt s PCP-a. Riješena struktura izolirane PCP domene je pokazala da su unatoč niskoj sličnosti na razini sekvence ove domene strukturno vrlo slične ACP-ovima te se također sastoje od 4 α -zavojnice.^{62,63} No, za razliku od ACP proteina koji su obično negativno nabijeni što je bitno za vezanje na FAS proteine, PCP domene su najčešće neutralne pri fiziološkom pH. One su dio čitavog megakompleksa NRPS-a, te vjerojatno nemaju potrebu za stvaranjem takvih interakcija. Hidrofobni džep, nađen kod ACP proteina za spremanje dugačkog acilnog lanca koji ga štiti od okoline nije primijećen kod PCP domena. Za razliku od ACP-a kod kojih nisu uočene velike konformacijske promjene između apo- i holo-forme, PCP domene su nađene u tri

različita konformacijska stanja. Apo-oblik PCP domene trećeg modula tirocidin-sintetaze je nađen u A konformaciji, ali i A/H stanju koje je nađeno i kod holo-PCP-a.⁶⁴ Za holo-PCP, uz A/H konformaciju je primijećena i samo za njega karakteristična H konformacija (slika 2.14). NMR titracije su pokazale da PPT-aza dolazi u interakciju samo s PCP-om u A konformaciji.⁶⁴ U toj je konformaciji omča sa serinom na koji PPT-aza veže prostetičku skupinu ispruženija čime se omogućuje pristup serina aktivnom mjestu. 4'-fosfopantetein je u A/H konformaciji bliže N-kraju PCP-a, te se prijelazom u H konformaciju pomiče prema C-kraju, pri čemu se α -zavojnica III razvija a zavojnica II pomiče (slika 2.14). U velikom sintetaznom kompleksu su tako veliki pomaci nužni za uspješno obavljanje funkcije i interakciju sa svim domenama. Kod ACP-a koji sudjeluju u biosintezi masnih kiselina nisu primijećene tako velike konformacijske promjene u proteinu, već samo u reorijentaciji prostetičke skupine. Iako je riješena struktura megakompleksa eukariotskog FAS sustava⁶⁵, fleksibilne ACP domene nisu jasno vidljive u mapama elektronske gustoće.



Slika 2.14. Strukturna fleksibilnost PCP domena trećeg modula tirocidin-sintetaze. PCP domena poprima različite konformacije vezanjem fosfopanteteinske ruke na konzervirani serin (štipači). A konformacija (PDB kod 2GDY) karakteristična je za apo-oblik PCP-a, A/H konformaciju (PDB kod 2GDW) poprimaju i apo- i holo-oblik, dok je H konformacija (PDB kod 2GDX) karakteristična samo za holo-oblik PCP-a.⁶⁴

Vrste roda *Rhizobium* posjeduju tri homologa ACP-a (NodF, AcpX i RkpF) koji su potrebni u biosintezi molekula na površini stanica bitnih za uspostavljanje simbioze između bakterija i biljke-domaćina. Protein-nosač NodF sudjeluje u proizvodnji polinezasićenih masnih kiselina koje se vežu na glukozamin pri izgradnji Nod-faktora bitnih za signalizaciju između simbionata. Iako *E. coli* FAS ACP ne može zamijeniti funkciju NodF *in vivo*, dizajniran je hibridni CP građen od N-kraja ACP-a i C-kraja NodF koji može obavljati funkciju NodF.⁶⁶

U Gram-pozitivnim bakterijama je nađen protein koji obavlja funkciju vrlo sličnu aminokiselina:[protein-nosač]-ligazama. D-alanil:[protein-nosač]-ligaza (Dcl ili DltA) aktivira D-alanin u D-alanil-adenilat te ga prenosi na 4'-fosfopanteteinsku skupinu D-alanil protein-nosača (Dcp). Dcp na koji je vezan D-alanin zatim sudjeluje u stvaranju D-alanil-lipoteikoične kiseline bitne u izgradnji peptidoglikanskog staničnog zida.⁶⁷ Za razliku od Bj Gly:CP-ligaze 1, Dcl može vezati aktiviranu aminokiselinu na FAS ACP. No, D-Ala vezan na ACP ne može se dalje koristiti u sintezi lipoteikoične kiseline.⁶⁷ Iako je Dcp kisele prirode (pI = 4.0) kao i ACP-i, pretpostavlja se da razlika u specifičnosti potječe od konzerviranog motiva RKEWD blizu C-kraja Dcp-a koji ne posjeduju FAS ACP-i. Kristalna struktura Dcl iz vrste *Bacillus cereus* je pokazala da ove ligaze dijele visoku strukturnu sličnost s adenilacijskim domenama neribosomskih peptid-sintetaza, ponajviše s fenilalanin-aktivirajućom domenom prvog modula gramicidin-S-sintaze I (PheA).⁶⁷

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Korištene kemikalije

Agaroza (*Sigma*), amonijev acetat (*Sigma*), amonijev sulfat (*Kemika*), ATP (*Sigma*), 1,4-ditiotreitol (skraćeno DTT; *Sigma*), glicerol (*Kemika*), kloridna kiselina, 36 % p.a. (*Kemika*), koenzim A (skraćeno CoA; *Sigma*), *L*-glicin (*Sigma*), natrijev acetat (*Sigma*), natrijev azid (*Fluka*), natrijev citrat dihidrat (*Sigma*), natrijev hidroksid (*Kemika*), natrijev kakodilat (*Sigma*), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-2-etansulfonska kiselina (skraćeno HEPES; *USB Corporation*), 5'-*O*-(*N*-glicil-sulfamoil)adenozin (analog glicil-adenilata, skraćeno GlyAMS; *Integrated DNA Technologies*), polietilen-glikol 4000 (skraćeno PEG 4K; *Sigma*), polietilen-glikol 8000 (skraćeno PEG 8K; *Sigma*), silikonska mast (*Bayer*), silikonska otopina u izopropanolu (*Serva*), tekući dušik.

3.1.2 Komercijalni kompleti

Crystal Screen (*Hampton Research*), Crystal Screen Cryo (*Hampton Research*), Silver Bullets (*Hampton Research*), ProPlex (*Molecular Dimensions*), PGA Screen Unmixed (*Molecular Dimensions*), Seed Bead (*Hampton Research*).

3.1.3 Materijali korišteni u kristalizaciji proteina

Grenada Crystallization Box (*Hampton Research*), okrugla pokrovna stakalca promjera 20 mm (*Thermo Scientific*), staklene kapilare (*Glas*), VDX ploče (*Hampton Research*), pribor za rukovanje kristalima (*Hampton Research*).

3.2 Metode

Određivanje trodimenzijske strukture proteina metodom difrakcije rendgenskih zraka zahtijeva pripremu jediničnog kristala proteina zadovoljavajuće veličine i kvalitete. Sve proteine korištene u ovoj disertaciji je prethodno klonirao, nadekspimirao u bakteriji *E. coli* te pročistio do stupnja vrlo visoke čistoće (> 98 %) dr. sc. Marko Močibob u Zavodu za biokemiju, PMF, Sveučilište u Zagrebu.

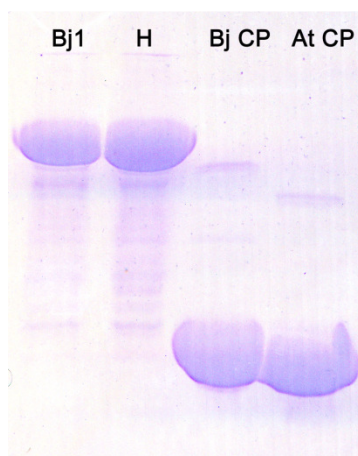
3.2.1 Kloniranje, nadekspresija i pročišćavanje *B. japonicum* glicin:[protein-nosač]-ligaze 1, hibrida glicin:[protein-nosač]-ligaze, te *B. japonicum* i *A. tumefaciens* protein-nosača

Geni za Bj Gly:CP-ligazu 1 (BII0957) i protein-nosače (Bj CP (Bsr0959) i At CP (Atu2571)) su amplificirani lančanom reakcijom polimeraze (PCR, eng. *polymerase chain reaction*) iz genomske DNA te klonirani u plazmidni vektor pET28b (*Novagen*) tako da proteinski produkti sadrže His₆-privjesak na N-kraju (restriksijska mjesta *NdeI/XhoI* ili *NdeI/BamHI*). Klonirani proteini su nadekspimirani u bakteriji *E. coli* BL21(DE3), te pročišćeni afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu (*Qiagen*). Stupanj čistoće proteina procijenjen je SDS-PAG elektroforezom (slika 3.1). Proteini su ukoncentrirani ultrafiltracijom, centrifugiranjem na koncentratorima *Amicon* (Millipore), te im je određena koncentracija Bradfordovom metodom. Pročišćena Bj Gly:CP-ligaza 1 pohranjena je u puferu sastava: 30 mmol dm⁻³ HEPES pH 7,0, 100 mmol dm⁻³ KCl, 4 mmol dm⁻³ DTT, NaN₃ volumnog udjela 0,02 % i glicerol volumnog udjela 15 %.

Protein-nosači ($\gamma = 1 \text{ mg cm}^{-3}$) su nakon pročišćavanja fosfopanteteinirani inkubiranjem u 0,5 mmol dm⁻³ koenzimu A, 10 mmol dm⁻³ MgCl₂, 4 mmol dm⁻³ DTT-u, pomoću enzima 4'-fosfopanteteinil-transferaze (Sfp) iz vrste *Bacillus subtilis* (0,012 - 0,1 mg cm⁻³) na sobnoj temperaturi 45 - 60 minuta. Reakcija je zaustavljena odstranjivanjem CoA i iona Mg²⁺ odsoljavanjem gel-filtracijom na koloni PD-10 (*GE Healthcare Life Sciences*). Protein-nosači su zatim ukoncentrirani ultrafiltracijom, te odvojeni od Sfp enzima gel-filtracijom na koloni Superdex 75 10/300 GL (*GE Healthcare*). Modifikacija je provjerena SDS-PAG elektroforezom i spektrometrijom masa.

Hibridna Gly:CP-ligaza koja se sastoji od katalitičke domene Bj Gly:CP-ligaze 1 i CP-vezne zavoynice iz alanin:[protein-nosač]-ligaze iz vrste *Agrobacterium tumefaciens* (At

Ala:CP-ligaza) dobivena je pomoću obrnutog (eng. *inverted*) PCR-a, tako da je umnožen čitav plazmid pET28b i gen za Bj Gly:CP-ligazu 1 bez regije koja kodira CP-veznu zavojnicu (V221-Q231). Linearni PCR-produkt je ligiran s fosforiliranim dvolančanim oligonukleotidom koji kodira za CP-veznu zavojnicu iz At Ala:CP-ligaze (236 AGKMLANNQRD 246). Klonirana ligaza je nadeksprimirana i pročišćena na isti način kao Bj Gly:CP-ligaza 1, te ukoncentrirana ultrafiltracijom do koncentracije 29 mg cm⁻³. Čistoća proteina je procijenjena SDS-PAG elektroforezom (slika 3.1). Svi proteini za kristalizaciju su čuvani na -80 °C.



Slika 3.1. Provjera čistoće pročišćenih proteina pomoću SDS-PAG elektroforeze. **Bj1** – *B. japonicum* Gly:CP-ligaza 1, **H** – hibridna Gly:CP-ligaza, **Bj CP** – *B. japonicum* protein-nosač i **At CP** – *A. tumefaciens* protein-nosač.

3.2.2 Kristalizacija proteina

3.2.2.1 Metoda strujanja para

Kristalizacija proteina strujanjem para je jedna od najčešće korištenih metoda za pripremu proteinskih kristala. Kapljica proteina se pomiješa s otopinom za kristalizaciju i stavi nad tu istu otopinu u zatvoreni bunarčić. Otopina za kristalizaciju se najčešće sastoji od precipitanta (tvar koja smanjuje topljivost proteina), soli i pufera. Na početku pokusa je koncentracija sastojaka otopine za kristalizaciju u kapljici manja nego u bunarčiću. Kako je sustav zatvoren, voda iz kapljice polako isparava ne bi li se postiglo ravnotežno stanje. Pri tome koncentracija proteina i precipitanta u kapljici raste dovodeći polako protein do stanja prezasićenosti čime se stvaraju uvjeti za nastanak kristala.

Korištene su dvije izvedbe kristalizacije strujanjem para: metoda viseće i metoda sjedeće kapi (slika 3.2). Kod metode viseće kapi, kap se postavlja na silikonizirano pokrovno

stakalce koje se zatim stavlja nad bunarčić tako da je u visećem položaju. Za razliku od viseće kapi, sjedeća se postavlja na postolje iznad bunarčića. Nakon postavljanja kristalizacijskog eksperimenta ploče s bunarčićima se ostavljaju na konstantnoj temperaturi te pregledavaju obično svaki dan tijekom prvog tjedna, a zatim jednom tjedno.



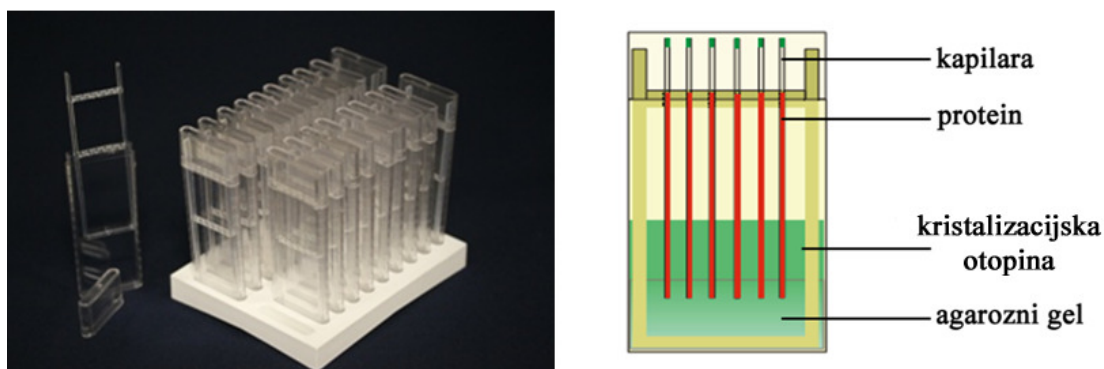
Slika 3.2. Shematski prikaz kristalizacije biomakromolekula metodom strujanja para. Prikazane su dvije izvedbe ove metode: metoda viseće kapi (*lijevo*) i metoda sjedeće kapi (*desno*).

Kako je zasad još nemoguće predvidjeti uvjete kristalizacije za svaki protein, bitno je pronaći početne uvjete u kojima nastaju kristali. Za to su korišteni komercijalno dostupni kompleti s prethodno pripremljenim otopinama za kristalizaciju za koje se ranije pokazalo da su uspješni u kristalizaciji proteina. Konkretno su korišteni kompleti Crystal Screen Cryo (*Hampton Research*), Proplex (*Molecular Dimensions*) i PGA Screen Unmixed (*Molecular Dimensions*). Nakon nalaženja početnih uvjeta kristalizacije uslijedila je optimizacija tih uvjeta kako bi se dobili što veći i kvalitetniji kristali. Optimizacija kristalizacijskih uvjeta je uključivala variranje koncentracije proteina, precipitanta, soli, pH pufera u otopini za kristalizaciju, te temperature.

3.2.2.2 Kristalizacija u kapilari

Kristalizacija proteina u kapilari je izvođena pomoću Grenada Crystallization Box kutijice. U nju se prvo ulije agarozni gel ($w = 1,5\%$) pripremljen tako da se agaroz otopi u uvjetu za kristalizaciju kojeg želimo optimirati. Zatim se odabere do šest kapilara različitog promjera ($0,1 - 0,5\text{ mm}$) koje se napune otopinom proteina. Gornja proširena strana tako napunjenih kapilara se zatvori silikonskom mašću, te se ubodu ($2 - 3\text{ mm}$ duboko) u pripremljeni gel. Agarozni gel se zatim prelije odabranom kristalizacijskom otopinom (tako da volumen tekućine bude jednak volumenu gela) i cijela kutijica se zatvori i dodatno izolira silikonskom mašću kako bi se postigao zatvoreni sustav (slika 3.3). Kristalizacijska otopina

polako difundira kroz gel do proteina u kapilari te se polako dostiže zasićenost, tj. prezasićenost proteina u otopini. Kako precipitant difundira dalje u kapilaru, polako iscrpljuje protein pri čemu se smanjuje stupanj prezasićenosti sve do postizanja ravnoteže i nastanka kristala. Na taj je način moguće ispitati čitav niz uvjeta u jednom eksperimentu.



Slika 3.3. Lijevo Grenada Crystallization Box kutijice. Desno Shematski prikaz kristalizacije proteina u kapilari.

3.2.2.3 Kristalizacija *B. japonicum* glicin:[protein-nosač]-ligaze 1

Neposredno prije kristalizacije enzim je centrifugiran 3 minute na 10 000 okretaja u minuti kako bi se mogući agregati proteina nastali u otopini spustili na dno mikroepruvete, te je uzorak proteina prebačen u čistu polipropilensku mikroepruvetu. Za nalaženje početne kristalizacijske otopine korišten je komercijalni komplet Crystal Screen Cryo (*Hampton Research*). Postavljane su viseće kapljice miješanjem 1 μL enzima koncentracije 21 mg cm^{-3} i 1 μL kristalizacijske otopine nad 700 μL kristalizacijske otopine pri 18 °C. Kristali proteina su izrasli nakon dva dana u kristalizacijskoj otopini koja je sadržavala 0,17 mol dm^{-3} amonijev acetat, 0,085 mol dm^{-3} natrijev acetat, PEG 4K ($w = 25,5 \%$) i glicerol (vol. udio 15 %). Radi dobivanja većih i kvalitetnijih kristala kristalizacijska otopina i koncentracija proteina su optimirani. Mijenjana je koncentracija proteina (10 – 21 mg cm^{-3}), precipitanta PEG 4K ($w = 20 - 30 \%$), pufera (0,05 – 0,15 mol dm^{-3}) i soli (0,11 – 0,23 mol dm^{-3}), te pH pufera (4,0 – 5,0), volumni udio glicerola (11 – 19 %), veličina kapi (1+1 – 3+3 μL) i temperatura kristalizacije (4 i 18 °C). Pokazalo se da je nastajanje kristala reproducibilno i da najkvalitetniji kristali nastaju u uvjetima jednakim početnoj kristalizacijskoj otopini ali sa nižom koncentracijom proteina (18 mg cm^{-3}).

3.2.2.4 Priprema i kristalizacija kompleksa *B. japonicum* glicin:[protein-nosač]-ligaze 1 i odgovarajućeg protein-nosača (Bj CP)

Kompleks Bj Gly:CP-ligaze 1 s odgovarajućim protein-nosačem je pripremljen neposredno prije postavljanja kristalizacije. Ligaza ($\gamma = 21 \text{ mg cm}^{-3}$) i Bj CP ($\gamma = 41 \text{ mg cm}^{-3}$) pomiješani su u stehiometrijskom omjeru 1:2 te su postavljene viseće kapi miješanjem 1 μL kompleksa i 1 μL kristalizacijske otopine iz komercijalnih kompleta Crystal Screen Cryo (*Hampton Research*) i ProPlex (*Molecular Dimensions*) pri 18 °C. Prvi kristali su nastali u kristalizacijskoj otopini koja je sadržavala 0,17 mol dm⁻³ amonijev sulfat, 0,085 mol dm⁻³ natrijev kakodilat pH 6,5, PEG 8K ($w = 25,5 \%$) i glicerol (vol. udio 15 %). Kristali su izrasli nakon 5 dana, a prisutnost kompleksa u kristalu provjerena je otapanjem ispranog kristala u vodi SDS-PAG elektroforezom. Kristalizacija je optimirana mijenjanjem koncentracije kompleksa (10 – 21 mg cm⁻³), precipitanta PEG 8K ($w = 20 - 30 \%$), pufera (0,05 – 0,15 mol dm⁻³) i soli (0,11 – 0,23 mol dm⁻³), te pH pufera (6,0 – 7,0), glicerola (vol. udio 10-20 %), veličine kapi (1+1 – 3+3 μL) i temperature kristalizacije (4 i 18 °C).

3.2.2.5 Priprema i kristalizacija kompleksa hibridne glicin:[protein-nosač]-ligaze i *A. tumefaciens* protein-nosača (At CP)

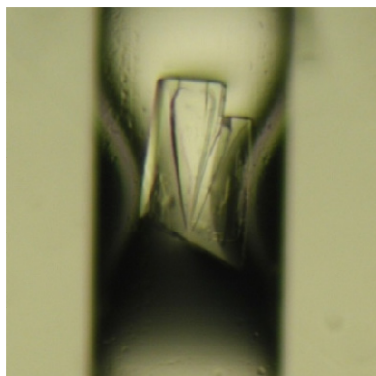
Hibridna Gly:CP-ligaza ($\gamma = 29 \text{ mg cm}^{-3}$) i At CP ($\gamma = 51 \text{ mg cm}^{-3}$) su pomiješani u stehiometrijskom omjeru 1:2 te je postavljena kristalizacija metodom viseće kapi koristeći komercijalne komplete Crystal Screen Cryo (*Hampton Research*) i ProPlex (*Molecular Dimensions*). Igličasti kristali su nastali nakon 2 – 3 dana u kristalizacijskoj otopini koja je sadržavala 0,17 mol dm⁻³ amonijev acetat, 0,085 mol dm⁻³ natrijev citrat dihidrat pH 5,6, PEG 4K ($w = 10 \%$) i glicerol (vol. udio 15 %). Kako bi se dobili veći i kvalitetniji kristali sastav kristalizacijske otopine je optimiran, te su isprobane razne metode kristalizacije (sjedeca kap i kristalizacija u kapilari). Mijenjana je koncentracija soli (0,11 – 0,23 mol dm⁻³), pH pufera (5,0 – 6,0), koncentracija kompleksa (10 – 29 mg cm⁻³), precipitanta PEG 4K ($w = 5 - 20 \%$), te je dodavan PEG 8K ($w = 5 - 20 \%$). U kapljicama pripravljenim miješanjem 1 μL kompleksa i 2 μL kristalizacijske otopine (0,17 mol dm⁻³ amonijev acetat, 0,085 mol dm⁻³ natrijev citrat dihidrat pH 5,6, PEG 4K ($w = 10 \%$), PEG 8K ($w = 10 \%$) i glicerol (vol. udio 15 %)) nakon 3 dana su izrasli najkvalitetniji kristali na 18 °C.

3.2.3 Namakanje kristala u otopinama malih liganda

Dobiveni kristali su namakani u otopinama malih liganda: glicinu, ATP-u, analogu glicil-adenilata (5'-*O*-(*N*-glicil-sulfamoil)adenozin, skraćeno GlyAMS), koenzimu A, te smjesi glicina i ATP-a. Otopine za namakanje su priređene tako da je svaki ligand ($c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$) razrijeđen u kristalizacijskoj otopini do konačne koncentracije 10 mmol dm^{-3} . Neposredno prije priprema otopina za namakanje ATP-u je dodan magnezijev klorid ($c = 300 \text{ mmol dm}^{-3}$). Kristali su namakani u trajanju od 5 minuta do 24 sata, te su zatim montirani u najlonsku omču odgovarajuće veličine i ohlađeni u struji dušika.

3.2.4 Priprema kristala za snimanje na sobnoj temperaturi

Da bi se provjerilo utječe li smrzavanje kristala na njegovu sposobnost difrakcije, kristal je montiran u kapilaru i testiran na sobnoj temperaturi. Kristal se u kapilaru uvuče zajedno s malo tekućine iz kapljice u kojoj je nastao, te se fiksira u kapilari tako da se tekućina oko njega izvuče tankim filter-papirom pazeći da se ne dodirne kristal. Zatim se kapilara zatvori pomoću zagrijanog voska pazeći da se na rubu ostavi malo namočenog filter papira kako bi se kristal zaštitio od isušivanja. Tako pripremljena kapilara s kristalom je stavljena na odgovarajući nosač i montirana na goniometarsku glavu difraktometra (slika 3.4).



Slika 3.4. Kristal Bj Gly:CP-ligaze 1 montiran u staklenu kapilaru promjera 0,7 mm.

3.2.5 Hlađenje proteinskih kristala

Rendgenske zrake oštećuju proteine tijekom snimanja što smanjuje moć difrakcije kristala i djeluje negativno na kvalitetu snimljenih podataka. To radijacijsko oštećenje se značajno smanjuje ukoliko se kristali snimaju na niskoj temperaturi (najčešće u struji dušika, oko 100 K). Kristali su obzirom na veličinu montirani u odgovarajuće najlonske omče, te direktno ohlađeni u tekućem dušiku. Kako su sve kristalizacijske otopine sadržavale barem 15 % volumnog udjela glicerola nije ih bilo potrebno prethodno namakati u krioprotekcijskoj tekućini. Ohlađeni kristali su zatim montirani na difraktometar, pri čemu su za vrijeme montiranja cijelo vrijeme uronjeni u tekući dušik. Za snimanja na sinkrotronu kristali su montirani na goniometar pomoću automatiziranog robota (eng. *Sample Changer*).

3.2.6 Difrakcija rendgenskih zraka na kristalu

Kristal Bj Gly:CP-ligaze 1 je montiran u kapilaru i snimljen na difraktometru Xcalibur Nova R (*Oxford Diffraction*) na sobnoj temperaturi (slika 3.4). Kristal je difraktirao do razlučivanja od oko 2,5 Å, ali zbog radijacijskog oštećenja nije uspješno sakupljen cijeli set podataka potreban za rješavanje strukture. Na sinkrotronu Soleil (Saint Aubene, Francuska), na zraci PROXIMA I, snimljen je čitav skup podataka na jednom kristalu Bj Gly:CP-ligaze 1 u struji dušika na temperaturi 100 K. Kristali Bj Gly:CP-ligaze 1 namakani u otopinama s malim ligandima (GlyAMS, ATP, CoA) su snimljeni na difraktometru Xcalibur Nova R (*Oxford Diffraction*) u struji dušika. Kompleks hibridne Gly:CP-ligaze i At CP-a namakan u analogu glicil-adenilata je snimljen na zraci ID29, sinkrotrona ESRF (Grenoble, Francuska). Svi ostali protein-protein kompleksi su snimljeni na sinkrotronskoj zraci BM14, ESRF (Grenoble, Francuska). Za svaku strukturu je sakupljen čitav skup podataka na jednom kristalu. U tablici 3.1 su navedeni uvjeti snimanja za svaku riješenu strukturu.

Dobivene difrakcijske slike su obrađene programom XDS⁶⁸ ili CrysAlis. Skaliranje, integriranje te izračunavanje amplituda strukturnih faktora iz izmjerenih intenziteta napravljeno je pomoću programa XDS ili Scala i Truncate (dio CCP4 paketa).⁶⁹

Tablica 3.1. Uvjeti snimanja proteinskih kristala.

Bj Gly:CP-ligaza +	uređaj/ zraka	detektor	valna duljina / Å	oscilacijski kut / °	vrijeme ekspozicije / s	ukupni broj difrakcijskih slika
AMP	PROXIMA I (Soleil)	CCD (ADSC QUANTUM 315r)	1,28200	0,5	0,7	400
GlyAMS	Xcalibur Nova R	CCD (OXFORD RUBY)	1,54056	1	60	180
ATP	Xcalibur Nova R	CCD (OXFORD RUBY)	1,54056	1	120	180
Bj CP +AMP	BM14 (ESRF)	CCD MARMOSAIC 225 mm	1,00512	1	30	180
Bj CP + GlyAMS	BM14 (ESRF)	CCD MARMOSAIC 225 mm	0,95373	1	30	180
Bj CP + ATP	BM14 (ESRF)	CCD MARMOSAIC 225 mm	0,95373	0,5	45	360
Bj Gly-CP	BM14 (ESRF)	CCD MARMOSAIC 225 mm	0,95374	1	30	180
H Gly:CP-ligaza +						
At CP +AMP	BM14 (ESRF)	CCD MARMOSAIC 225 mm	0,95372	0,5	30	400
At CP +GlyAMS	ID29 (ESRF)	PIXEL (PSI PILATUS 6M)	1,28215	0,1	0,2	3600
At CP + ATP	BM14 (ESRF)	CCD MARMOSAIC 225 mm	0,95372	1	30	150

3.2.7 Metode rješavanja trodimenzijskih struktura rendgenskom difrakcijom

Iz difrakcijskih slika dobivenih izlaganjem kristala rendgenskom zračenju moguće je izmjeriti intenzitete valova raspršenih s ravnina u kristalu (hkl ravnina). Intenzitet svakog vala (I_{hkl}) izmjerenog na detektoru je proporcionalan kvadratu amplitude vala ($|F_{hkl}|$): $I_{hkl} \approx |F_{hkl}|^2$. Amplituda i faza raspršenog vala su komponente strukturnog faktora, F_{hkl} . Kada su poznati strukturni faktori moguće je Furierovom transformacijom izračunati elektronsku gustoću (jednadžba 1), odnosno odrediti strukturu molekule. Možemo mjeriti amplitudu vala, no fazu vala gubimo tijekom eksperimenta, što se naziva problem faze u kristalografiji. Kako je elektronska gustoća Furierov transformat strukturnih faktora, raspolažemo li nekim prethodnim saznanjem o strukturi molekule ili elektronskoj gustoći, možemo doći do vrijednosti faza. To je početna pretpostavka koja vrijedi za sve metode traženja faze.

$$(1) \quad \rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} \underbrace{|F_{hkl}| e^{i\alpha(hkl)}}_{\text{strukturni faktor, } F_{hkl}} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

$\rho(xyz)$ – funkcija elektronske gustoće

x, y, z – frakcijske koordinate u jediničnoj ćeliji

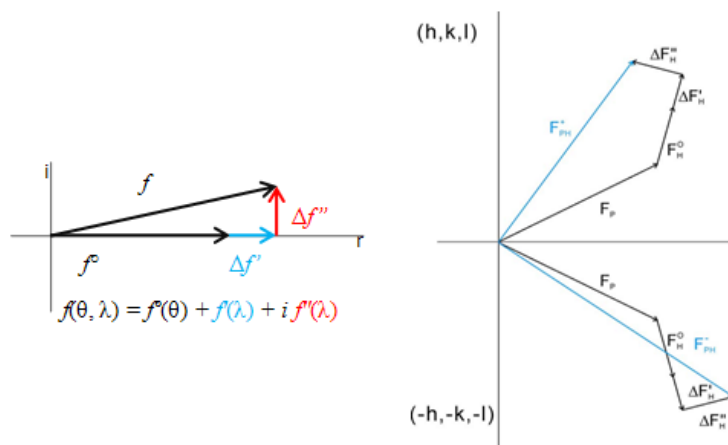
V – volumen jedinične ćelije

α_{hkl} – faza vala raspršenog s porodice ravnina hkl

$|F_{hkl}|$ – amplituda strukturnog faktora, ovisna o atomskom faktoru raspršenja (f) koji je specifičan za svaki kemijski element te ovisi o broju elektrona u atomu i kutu raspršenja (2θ)

3.2.7.1 SAD eksperiment (eng. *single-wavelength anomalous dispersion*)

Kada energija rendgenske zrake koja pada na kristal odgovara apsorpcijskom pragu nekog određenog kemijskog elementa u kristalu, dolazi do apsorpcije energije vala i izbacivanja jednog elektrona iz unutarnje ljuske tog atoma. Zatim elektron iz više ljuske atoma prelazi u nižu pri čemu se emitira rendgensko zračenje. Rezultat apsorpcije je raspršeni pomaknuti val, te atomski faktor raspršenja f , koji je kod normalnog raspršenja skalarna veličina sada postaje vektorska (slika 3.5). Atomski faktor raspršenja ima tri komponente: normalno ili obično raspršenje (f^o) ovisno o kutu raspršenja i dvije komponente (disperzivna i anomalna ili apsorpcijska) neovisne o kutu raspršenja već o valnoj duljini (λ). Disperzivna komponenta ($\Delta f'$) smanjuje normalni faktor raspršenja, dok je apsorpcijska komponenta ($\Delta f''$) pomaknuta u fazi za 90° . To uzrokuje poništenje Friedelovog zakona ($|F_{hkl}| \neq |F_{-h-k-l}|$, slika 3.5) i omogućuje mjerenje anomalnih razlika između amplituda Friedelovih parova (Bijvoet-ova razlika) što se može iskoristiti za pronalazak koordinata atoma na kojima dolazi do anomalnog raspršenja u kristalu, odnosno za određivanje podstrukture molekule u asimetričnoj jedinici pomoću direktnih metoda.



Slika 3.5. Lijevo komponente atomskog faktora raspršenja kod anomalne disperzije atoma. Desno U prisustvu anomalnog raspršenja ne vrijedi Friedelov zakon, $|F_{hkl}| \neq |F_{-h-k-l}|$. SAD eksperimentom se mjeri Bijvoetova razlika, $\Delta F^\pm = |F_{PH}(+)| - |F_{PH}(-)|$.

Elementi koji mogu poslužiti za anomalno raspršenje su najčešće teški atomi s velikim brojem elektrona (pr. Hg, Pt, Fe, Cu, Zn) jer daju dovoljno mjerljive promjene u intenzitetu difrakcije. Kada je poznata podstruktura, moguće je izračunati faze za čitavu strukturu. To je u početku samo procjena faza, ali su dovoljno točne za izračunavanje interpretabilne mape elektronske gustoće.

Za SAD eksperiment je dovoljan jedan kristal i snimanje seta podataka pri samo jednoj valnoj duljini. Problem odabira između dviju mogućih faza za svaki refleks (eng. *phase ambiguity*), kod SAD eksperimenta rješava se metodom poboljšanja mapa elektronske gustoće nazvanom ravnjanje otapala (eng. *solvent flattening*), pri čemu kao rezultat dobivamo dvije mape – jednu koja sadrži samo šum, te drugu, s fazama koje daju mapu elektronske gustoće koju je moguće interpretirati. Trenutno je oko 75 % svih struktura čije su faze dobivene eksperimentalno riješeno SAD eksperimentom.

Struktura Bj Gly:CP-ligaze 1 je riješena metodom anomalne disperzije na cinkovom atomu (SAD eksperiment). Kako je iz strukture mMbSerRS poznato da sadrži cinkov ion u aktivnom mjestu⁷, testom PAR-PMPS je potvrđeno da i Bj Gly:CP-ligaza 1 sadrži cinkov ion (test napravio dr. sc. Močibob). PMPS ((4-hidroksiživa(II))fenilsulfonska kiselina) stvara Hg-S veze s proteinom pri čemu dolazi do denaturacije i oslobađanja cinka, te spoj PAR (4-(2-piridilazo)rezorcinol) veže oslobođeni cink dajući kompleks crvene boje (Zn(PAR)_2) čija se apsorbcija može spektrofotometrijski mjeriti pri valnoj duljini 500 nm.

Nakon montiranja kristala na goniometar (zraka PROXIMA I, sinkrotron Soleil) pomoću rendgenske apsorpcijske spektrometrije snimljen je apsorpcijski spektar cinka u kristalu. Kako je za SAD eksperiment dovoljan samo jedan skup podataka, odabrana je valna duljina rendgenskog zračenja koje odgovara apsorpcijskom maksimumu cinka ($\lambda = 1,242 \text{ \AA}$) jer je pri toj valnoj duljini anomalni efekt raspršenja na cinkovim atomima najveći. Faze bitne za dobivanje prvih mapa elektronske gustoće i poboljšanje mapa elektronske gustoće napravljeni su pomoću programa autoSHARP.⁷⁰

3.2.7.2 Metoda molekulske zamjene

Kada postoji model molekule sličan strukturi proteina koju želimo odrediti (sličnost sekvenci > 25 % i rmsd između C^α atoma < 2 Å), moguće je posuditi faze modela te ih iskoristiti kao početne faze prilikom rješavanja nove strukture. Postoji više programa za molekulska zamjenu koji koriste različite pristupe i metode nalaženja rješenja strukture. U

ovoj disertaciji za molekulsku zamjenu je korišten program EPMR.⁷¹ Za razliku od većine programa koji se koriste za molekulsku zamjenu, EPMR ne dijeli problem nalaženja molekule u jediničnoj ćeliji na odvojene rotacijske i translacijske pretrage. Umjesto toga koristi algoritam evolucijske pretrage kako bi simultano optimirao orijentaciju i položaj modela u jediničnoj ćeliji.

Program radi na slijedeći način:

1. Generira se početni set nasumičnih rješenja strukture (nasumično odabrane orijentacije i položaj modela).
2. Za svako rješenje se izračuna korelacijski koeficijent.
3. Dio rješenja s najboljim korelacijskim koeficijentom se zadrži te koristi za generiranje potpuno novih rješenja. To se radi primjenom nasumičnih alteracija na orijentacijske kutove i translacije za svako „preživjelo“ rješenje.
4. Za novostvorenu populaciju rješenja se izračunaju korelacijski koeficijenti, nakon čega se generira novi skup rješenja iz najbolje rangiranih modela, te se procedura ponavlja određeni broj ciklusa.

Algoritam omogućuje široko, stohastičko, inicijalno pretraživanje prostora, pri čemu se postupno fokusira na najizglednija područja. Omogućuje efikasno pretraživanje 6D (3 parametra rotacije i translacije) prostora. Općenito, nekoliko je redova veličina brži od sistematskih 6D pretraga. Na kraju evolucijske optimizacije se napravi lokalna minimizacija najboljeg rješenja (utočnjavanje krutog tijela, eng. *rigid-body refinement*). Prema standardnim postavkama, program radi 20 ciklusa pretraživanja, no kod složenijih slučajeva potrebno je znatno više. Kako su sve strukture određivane molekulskom zamjenom gotovo identične Bj Gly:CP-ligazi 1, 20 ciklusa je bilo dovoljno za pronalazak njihovog rješenja.

3.2.7.3 Izgradnja modela

Automatska izgradnja modela Bj Gly:CP-ligaze 1 je napravljena pomoću programa Arp/wARP.⁷² Za izgradnju modela kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 i Bj CP, te kompleksa hibridne Gly:CP-ligaze i At CP-a je korišten program Buccaneer.⁷³ Razlog tomu je da su nakon molekulske zamjene mape elektronske gustoće za protein-nosače u kompleksima bile slabije kvalitete obzirom na razlučivanje što ukazuje na fleksibilnost protein-nosača u kristalu. Program Buccaneer je poznat po uspješnijoj izgradnji modela s lošijim razlučivanjem od programa Arp/wARP. I u ovom slučaju je pomoću Buccaneer programa izgrađen barem dio

protein-nosača, dok je Arp/wARP izgradio samo ligaze i niti jedan CP. Svi modeli su ručno dograđeni u programu Coot.⁷⁴ Coot je korišten i za dodavanje molekula voda i liganada u model.

3.2.7.4 Utočnjavanje modela

Bj Gly:CP-ligaza 1, te strukture s malim ligandima utočnjavani su pomoću programa Refmac5⁷⁵, koji koristi metodu maksimalne vjerodostojnosti. Cilj utočnjavanja strukture jest prilagoditi početni model da što bolje odgovara difrakcijskim podacima, a pri tome zadovoljava poznata saznanja o kemijskoj prirodi molekula (duljine i kutovi kemijskih veza, dihedralni kutovi, stereokemija itd.). Pri kraju utočnjavanja je korišten program BUSTER/TNT⁷⁶ koji također radi na principu metode maksimalne vjerodostojnosti, ali su se vrijednosti devijacije duljina veza i kuteva značajno smanjile korištenjem standardnih postavki ovog programa.

Za utočnjavanje struktura kompleksa ligaza s odgovarajućim protein-nosačima korišten je program *Phenix.refine*⁷⁷ koji također radi na principu metode maksimalne vjerodostojnosti. Ovaj program je korišten zbog najlakšeg načina opisivanja kovalentne veze između serina protein-nosača i prostetičke skupine 4'-fosfopanteteina. Utočnjavanje je rađeno sve dok vrijednosti R i R_{free} faktora nisu konvergirale i dok gotovo čitave mape elektronske gustoće nisu interpretirane. R -faktori predstavljaju mjeru slaganja kristalografskog modela i eksperimentalnih podataka.

3.2.7.5 Analiza i interpretacija struktura

Procjena kvalitete modela proteina dobivenih određivanjem kristalnih struktura je napravljena pomoću programa ProCHECK⁷⁸, SFCHECK⁷⁹ i Molprobity⁸⁰. Sve slike su napravljene u programu Pymol.⁸¹

Strukturne razlike istraživanih molekula su proučavane pomoću raznih programa. Za usporedbu sličnosti struktura korišten je program SUPERPOSE (dio CCP4 paketa), dok je za proučavanje dodirnih površina proteina u kompleksima korišten program PISA.⁸²

3.2.8 Kontrolirana dehidracija proteina

Poznato je da dehidracija može značajno utjecati na moć difrakcije kristala, najčešće tako da kristal potpuno izgubi sposobnost difrakcije. No, poznati su i mnogi primjeri kratkotrajnog (i kontroliranog) isušivanja kristala nakon čega su se razlučivanje i mozaičnost kristala značajno popravili⁸³, a moguća je i promjena simetrije tj. prostorne grupe kristala. Kako bi se poboljšala moć difrakcije kristala kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 i Bj CP, korišten je sustav za kontrolu vlažnosti zraka (eng. *humidity control device*) na BM14 zraci, ESRF (slika 3.6) koji omogućuje preciznu dehidraciju kristala. Kristali se montiraju na goniometarsku glavu pomoću malih mrežica (eng. *mesh*), u struju zraka zasićenog točno određenim postotkom vode koji se prethodno odredi mjereći relativnu vlažnost kristala. Nakon izlaganja kristala rendgenskoj zraci, provjerava se razlučivanje difrakcije te odredi dimenzije jedinične ćelije. Postupak se postupno ponavlja nakon izlaganja kristala struji zraka s još manjim postotkom vode u koracima od 0,5 %, sve dok se ne primijete promjene u difrakciji ili dimenzijama jedinične ćelije. Ukoliko se vidi poboljšanje u razlučivanju, kristali se neposredno prije snimanja izlože struji zraka s postotkom vode koji je dao najbolje rezultate, te se zatim snimi cijeli skup podataka u struji dušika.

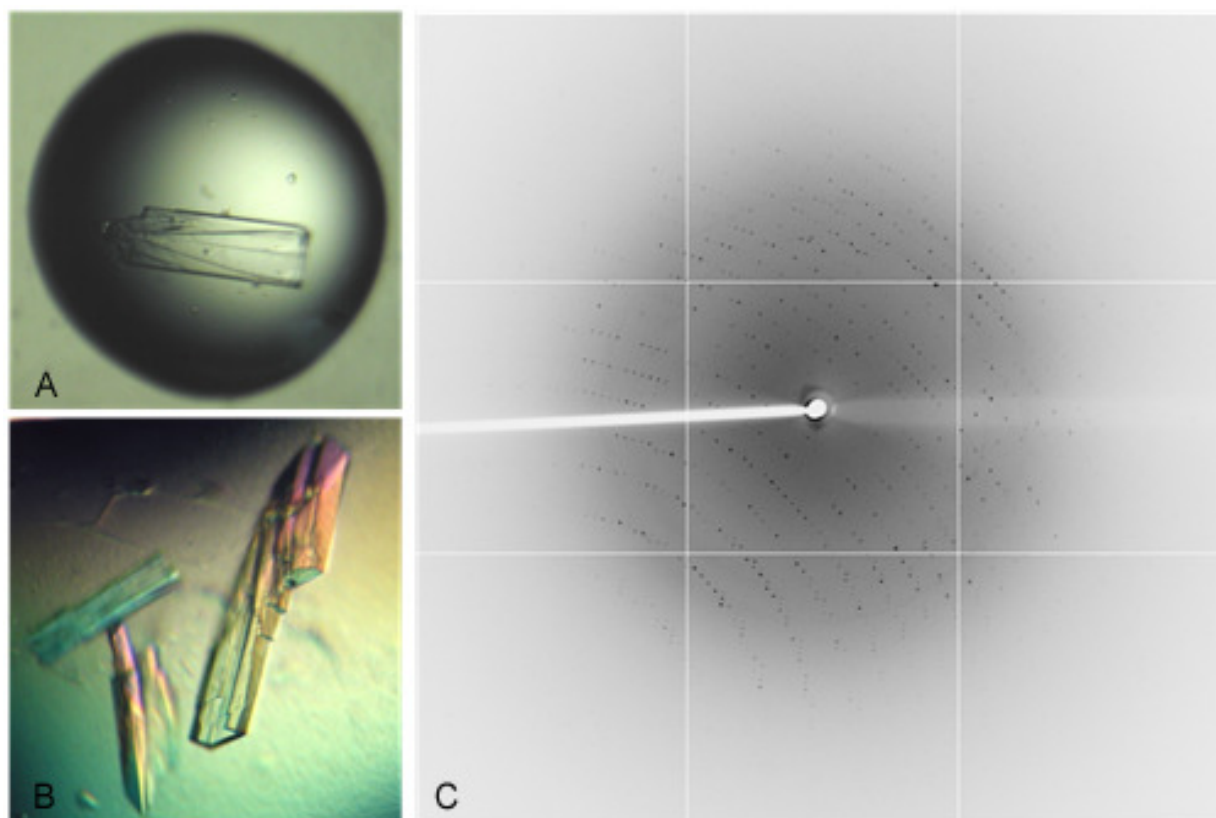


Slika 3.6. BM14 zraka, sinkrotron ESRF. Instrument kontrolirane vlažnosti zraka (*Humidity control device*) je naglašen crvenom linijom. Preuzeto iz http://www.embl.fr/services/synchrotron_access/bm14/10-guide/12-humidity_control_device/.

4 REZULTATI

4.1 Određivanje kristalne strukture *B. japonicum* glicin:[protein-nosač]-ligaze 1

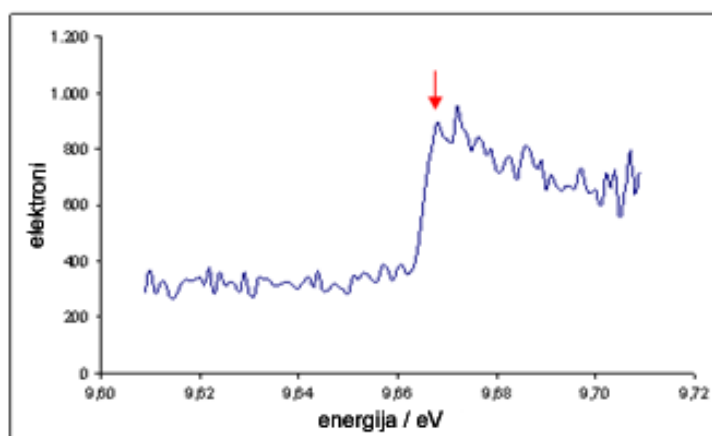
Kristali Bj Gly:CP-ligaze 1 (slika 4.1A, B) su dobiveni metodom viseće kapi miješajući 1 μL proteina ($\gamma = 18 \text{ mg cm}^{-3}$) i 1 μL kristalizacijske otopine koja je sadržavala 0,17 mol dm^{-3} amonijev acetat, 0,085 mol dm^{-3} natrijev acetat pH 4,6, PEG 4K ($w = 25,5 \%$) i glicerol (vol. udio = 15 %). Kristali su ohlađeni u tekućem dušiku te je snimljen potpuni set podataka na zraci PROXIMA 1 (Soleil sinkrotron, Francuska) do razlučivanja 2,15 Å.



Slika 4.1. A, B Kristali Bj Gly:CP-ligaze u visećoj kapljici (1 + 1 μL) veličine otprilike 0,5x0,1x0,05 mm. C Difrakcijska slika kristala Bj Gly:CP-ligaze na zraci PROXIMA I, CCD detektor ADSC QUANTUM 315r (razlučivanje 2 Å).

Problem faze poznat u proteinskoj kristalografiji je riješen metodom anomalne disperzije na atomima cinka (SAD eksperiment) za koje je već bilo poznato da se nalaze u aktivnom mjestu Bj Gly:CP-ligaze 1. Nakon što je provjerena difrakcijska sposobnost kristala (slika 4.1C) snimljen je fluorescencijski spektar radi određivanja energije, odnosno valne duljine apsorpcijskog maksimuma cinkovih atoma (slika 4.2). To je bitno za mjerenje

maksimalnog anomalnog signala raspršenja cinka, te određivanje točnih anomalnih faktora raspršenja (f' i f'' vrijednosti). Iako se mogu izračunati teoretske f' i f'' vrijednosti za izolirani atom cinka u vakuumu, one su podložne promjeni zbog kemijskog okruženja u proteinu te ih je poželjno eksperimentalno odrediti. Iz izmjerene fluorescencijskog spektra cinka u kristalu određen je njegov maksimum, te očitane vrijednosti f' i f'' koje su iznosile -6,87 i 5,88. Potpuni set podataka je snimljen na valnoj duljini 1,282 Å, pri kojoj je apsorpcija cinka maksimalna. Kako bi se dobio što veći broj više puta izmjerenih istih refleksa radi dobivanja što točnijih podataka, snimljeno je ukupno 200°, pri oscilacijskom kutu 0,5°.



Slika 4.2. Apsorpcijski spektar rendgenskih zraka na kristalu Bg Gly:CP-ligaze 1.

Nakon procesiranja difrakcijskih slika pomoću programa XDS⁶⁸ nađene su dimenzije ćelije $a = 127,7$ Å, $b = 100,2$ Å i $c = 50,2$ Å, te je pomoću programa Pointless⁸⁴ određena prostorna grupa $P 2_1 2_1 2$. Podaci o mjerenju, uz odgovarajuću statistiku, navedeni su u tablici 4.1. Pomoću programa autoSHARP⁷⁰ su dobivene prve mape elektronske gustoće iz kojih su se mogle uočiti elementi sekundarne strukture proteina (slika 4.3). Za izgradnju modela je korišten program ARP/wARP⁷² koji je izgradio većinu proteina, dok su vode i ostatak modela izgrađeni ručno u programu Coot.⁷⁴

U asimetričnoj jedinici se nalaze dva lanca Bg Gly:CP-ligaze 1 koji tvore homodimer. U mapi elektronske gustoće je izgrađen gotovo čitav lanac A (aminokiseline 17-315), dok je u lancu B elektronska gustoća za aminokiseline 214-233 vrlo slaba. Izoštavanjem mapa pomoću programa Coot i korištenjem odgovarajućeg aminokiselinskog dijela iz lanca A kao predloška, ručno su izgrađene spomenute aminokiseline u lancu B. Pregledom kristalnih kontakata je uočeno da aminokiseline 214-233 lanca A ostvaruju kontakte sa susjednim molekulama u kristalu, dok kod lanca B to nije slučaj. Prosječni B-faktori za aminokiseline 214-233 u lancu B ($84,8$ Å²) značajno su viši nego u lancu A ($42,3$ Å²). Model je utočnjavao

pomoću programa Refmac5⁷⁵ i BUSTER/TNT⁷⁶, sve dok većina mape elektronske gustoće nije interpretirana i nije bilo promjene R/R_{free} -faktora. Procjena kvalitete strukture je napravljena pomoću programa PROCHECK (slika 4.4).⁷⁸

Tablica 4.1. Statistika snimanja podataka kristala Bj Gly:CP-ligaze 1.

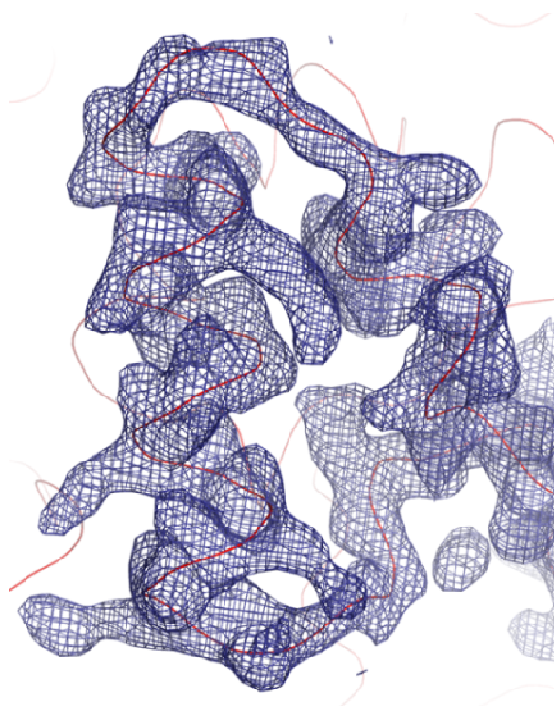
Bj Gly:CP-ligaza 1	(Zn maksimum)
PDB kod	3MF2
Prostorna grupa	$P 2_1 2_1 2$
Razlučivanje / Å	46,74-2,15 (2,28-2,15)*
Dimenzije jedinične ćelije	
a, b, c / Å	127,67, 100,24, 50,23
α, β, γ / °	90, 90, 90
Valna duljina zračenja / Å	1,282
Ukupni broj izmjerenih refleksa	278 833 (40 479)
Broj nezavisnih refleksa	35 906 (5 027)
Kompletnost podataka / %	99,4 (96,8)
Redundantnost	7,8 (7,2)
R_{meas} / %	6,4 (47,2)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	16,2 (3,4)

* vrijednosti u zagradama odnose se na ljusku s najvećim razlučivanjem.

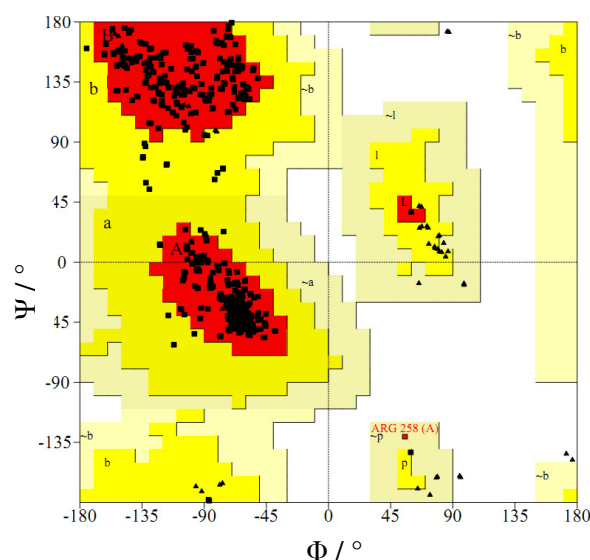
$$R_{\text{meas}} = \{ \sum_{hkl} [N/(N-1)]^{1/2} \sum_i |I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle| \} / \sum_{hkl} \sum_i I_{hkl},$$

I_{hkl} – izmjereni intenziteti, $\langle I_{hkl} \rangle$ – prosječni intenziteti, N - multiplicitet hkl refleksa

$\langle I/\sigma(I) \rangle$ - omjer intenziteta difrakcije i pogreške



Slika 4.3. $2F_o - F_c$ mapa elektronske gustoće dobivene SAD eksperimentom na kristalu Bj Gly:CP-ligaze 1.
 F_o – opaženi strukturni faktor, F_c – izračunati strukturni faktor



Slika 4.4. Ramachandranov dijagram Bj Gly:CP-ligaze 1:

u najpovoljnijim područjima:	94,9 %
u dodatno dopuštenim područjima:	4,9 %
u uvjetno dopuštenim područjima:	0,2 %
u nedopuštenim područjima:	0,0 %

$$R = \{ \sum |F_o| - |F_c| \} / \sum |F_o|,$$

R_{free} – R -faktor za izdvojeni nasumični skup refleksa (5 %) koji nije uključen u proces utočnjavanja.

Tablica 4.2. Statistika utočnjavanja modela Bj Gly:CP-ligaze 1.

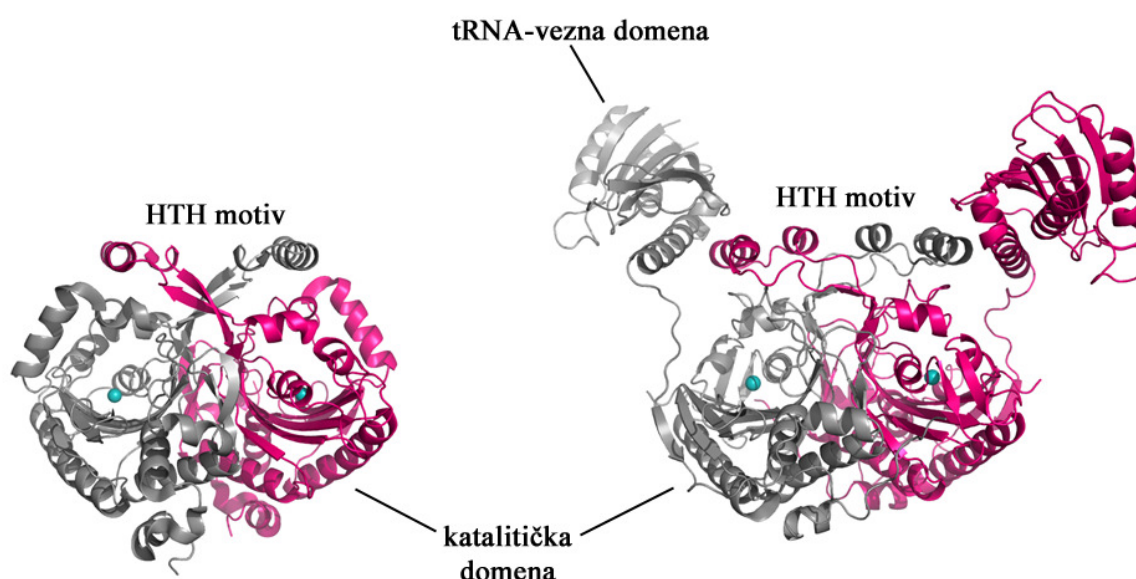
Razlučivanje / Å	46,74-2,15
Broj korištenih refleksa	34 110
Broj refleksa u probnom skupu	1 156
R/R_{free} / %	18,6 / 24,64
Broj nevodikovih atoma proteina	4 911
Broj nevodikovih atoma liganda/ion	58/2
Broj molekula vode	170
B-faktori / Å ²	
protein	41,31
ligandi/ioni	57,95/30,65
vode	43,72
Standardna odstupanja od idealnih vrijednosti (rmsd)	
duljine veza / Å	0,010
vezni kutovi / °	1,01

4.2 Struktura *B. japonicum* glicin:[protein-nosač]-ligaze 1 i usporedba s metanogenim tipom seril-tRNA-sintetaze

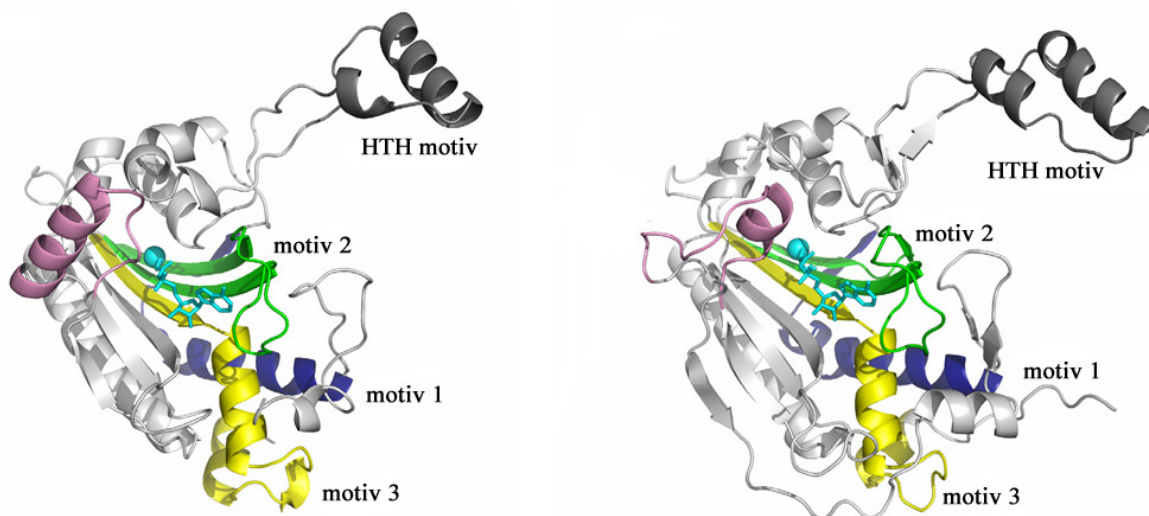
Bj Gly:CP-ligaza 1 je homodimerni protein čija struktura pokazuje visoku sličnost s katalitičkom domenom seril-tRNA-sintetaze metanogenog tipa (mMbSerRS) unatoč niskoj sličnosti na razini aminokiselinske sekvence (17 %). Te su dvije strukture uspoređene preklapanjem njihovih C^α atoma (PDB kodovi 3MF2 i 2CIM) pomoću programa SUPERPOSE (dio CCP4 paketa⁸⁵) pri čemu je izračunat rmsd 2.94 Å. Rmsd (eng. *root-mean-square-deviation*) je mjera za prosječnu udaljenost između atoma dvaju preklopljenih (superponiranih) proteina.

Najveća razlika između tih dvaju proteina je nedostatak N-terminalne domene koja je kod mMbSerRS bitna za vezanje molekule tRNA (slika 4.5).⁷ Katalitička domena Bj Gly:CP-ligaze 1 je građena od sedam antiparalelnih β-lanaca okruženih α-zavojnica. U katalitičkoj domeni ligaze su strukturno očuvani motivi 1 i 3 karakteristični za cijeli razred II aminoacil-tRNA-sintetaza. Motiv 2, bitan za prepoznavanje 3'-kraja tRNA je nešto kraći i sastoji se od dva duga β-lanca, dok kod mMbSerRS motiv 2 čine tri β-lanca, jedan dulji i dva kraća

povezana omčom (slika 4.6). Motiv zavojnica-okret-zavojnica (HTH) karakterističan za mMbSerRS je također strukturno očuvan, s time da je unutarnja zavojnica nekoliko aminokiselina kraća kod Bj Gly:CP-ligaze 1 (slika 4.6). Kao i kod mMbSerRS, motiv HTH jedne podjedinice prepliće se s drugim motivom HTH pokrivajući katalitičku jezgru druge podjedinice, čime značajno doprinosi stabilnosti homodimera. U kristalnoj strukturi Bj Gly:CP-ligaze 1 je uočena prisutnost disulfidne veze između Cys93 dviju podjedinica homodimera. No, analiza SDS-PAG elektroforezom bez prisutnosti β -merkaptetanola nije potvrdila prisutnost disulfidnih mostova. Kako je poznato da gusto pakiranje proteina u kristalu može prouzročiti nastajanje disulfidnih veza, zaključeno je da se i u ovom slučaju najvjerojatnije radi o artefaktu.



Slika 4.5. Usporedba trodimenzijskih struktura Bj Gly:CP-ligaze 1 (lijevo) i mMbSerRS (desno). Podjedinice proteina su obojane sivo i ružičasto. Atom cinka u aktivnom mjestu je prikazan kao zelena kuglica.

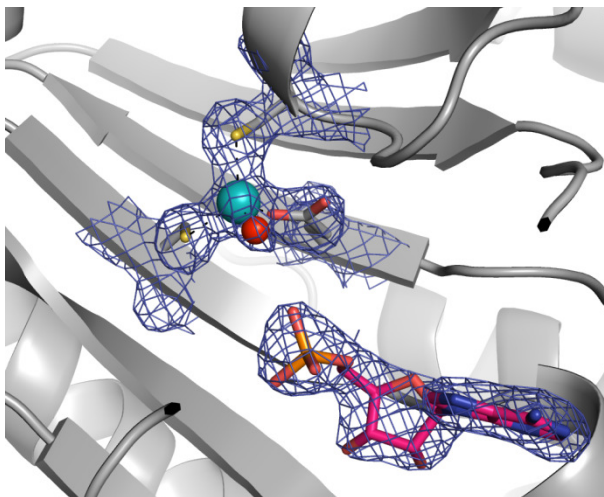


Slika 4.6. Usporedba katalitičkih domena Bj Gly:CP-ligaze 1 (A) i mMbSerRS (B). Motivi 1 (plavo), 2 (zeleno) i 3 (žuto) karakteristični za aaRS razreda II očuvani su i kod Bj Gly:CP-ligaze 1. Najveća razlika između domena je serin-uređujuća omča (ljubičasto) koja je kod ligaze zamijenjena omča-zavojnica motivom (ljubičasto).

Osim nedostatka N-terminalne domene, najuočljivija razlika između Bj Gly:CP-ligaze 1 i mMbSerRS je u području „serinske omče“, koja je kod mMbSerRS potpuno neuređena u odsustvu serina (aminokiseline 394-410). Vezanjem serina u aktivno mjesto dolazi do konformacijske promjene i formiranja serinske omče koja dolazi u blizinu cinka i zatvara aktivno mjesto. Kod Bj Gly:CP-ligaze 1 dio koji odgovara serinskoj omči je građen u obliku omče koju slijedi 12 aminokiselina duga α -zavojnica (aminokiseline 220-232). Ta regija je smještena dalje od aktivnog mjesta, pri čemu je zavojnica izložena otapalu (slika 4.6).

4.3 Strukturna analiza aktivnog mjesta Bj Gly:CP-ligaze 1

U svakom od dva aktivna mjesta molekule Bj Gly:CP-ligaze 1 je smješten ion cinka, tetrakoordiniran s tri visoko očuvane aminokiseline (Cys131, Glu176 i Cys279) i jednom molekulom vode (slika 4.7). Ovako građeno aktivno mjesto je vrlo slično onom u metanogenom tipu SerRS, pri čemu je bočna skupina aminokiseline glutamata koja koordinira ion cinka drugačije orijentirana. Iako Bj Gly:CP-ligazi 1 niti njenim kristalima nije ništa osim cinka dodavano tijekom ekspresije i pročišćavanja, u oba je aktivna mjesta u strukturi nađena dodatna elektronska gustoća koja je interpretirana kao molekula adenozin-monofosfata (AMP, slika 4.7). Vjerojatno je da molekule AMP-a potječu od hidroliziranog ATP-a koji je enzim vezao kao supstrat tokom ekspresije u stanicama *E. coli*.



Slika 4.7. Aktivno mjesto Bj Gly:CP-ligaze 1 (sivo). Cink je označen kao plava, a molekula vode kao crvena kuglica. U aktivnom mjestu je nađena elektronska gustoća ($2F_o - F_c$ mapa razlučivanja 2,15 Å, na razini 1,5 σ) koja odgovara molekuli AMP-a (ružičasti štapići). Aminokiseline koje koordiniraju cink (Cys131, Glu176 i Cys279) su označene kao štapići.

4.4 Vežanje malih supstrata u aktivno mjesto Bj Gly:CP-ligaze 1

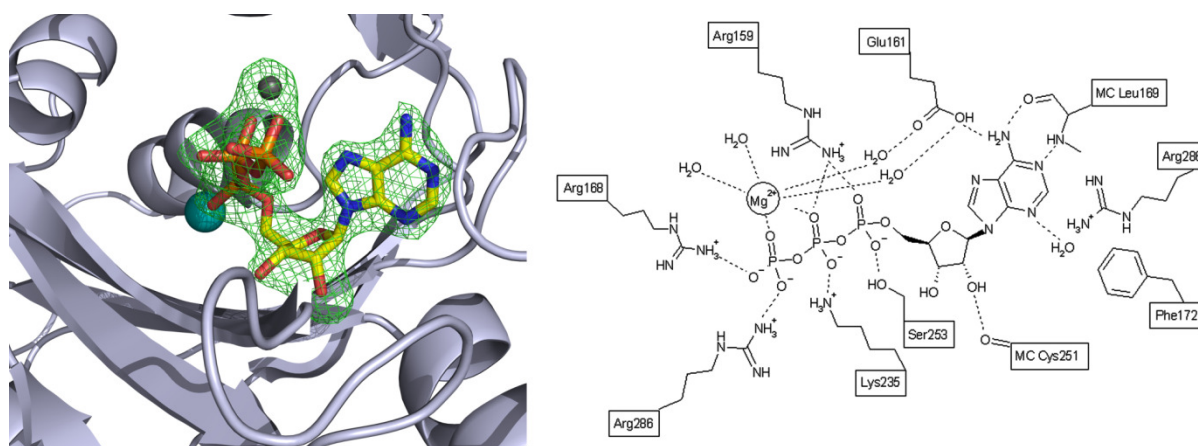
Kako bi se razjasnio način vežanja malih supstrata u aktivno mjesto, kristali Bj Gly:CP-ligaze 1 su namakani u otopinama koje su sadržavale glicin, ATP i analog glicil-adenilata. Kristali su namakani u kristalizacijskim otopinama koje su sadržavale svaki od navedenih supstrata pojedinačno ($c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$) te su ohlađeni u tekućem dušiku. Eksperimentalni podaci su snimljeni na difraktometru XCalibur Nova R (*Oxford diffraction*) te obrađeni pomoću programa CrysAlis, Scala i Truncate. Strukture su riješene metodom molekulske zamjene pri čemu je struktura Bj Gly:CP-ligaze 1 s AMP-om (PDB kod 3MF2) bez liganada i molekula vode korištena kao početni model. Statistički podaci koji ukazuju na kvalitetu snimljenih podataka za strukture Bj Gly:CP-ligaze 1 s ATP-om i GlyAMS-om u aktivnom mjestu prikazani su u tablici 4.3. Pomoću programa BUSTER i Refmac5 izračunate su diferencijalne mape elektronske gustoće ($F_o - F_c$) iz kojih se moglo interpretirati vezao li se željeni ligand u aktivno mjesto ili ne.

Tablica 4.3. Statistika snimanja podataka kristala te točnosti modela Bj Gly:CP-ligaze 1 u kompleksu s ATP-om i GlyAMS-om. * Vrijednosti u zagradama odnose se na ljusku s najvećim razlučivanjem.

	Bj Gly:CP-ligaza 1 + ATP	Bj Gly:CP-ligaza 1 + GlyAMS
PDB kod	3MEY	3MF1
Prostorna grupa	$P 2_1 2_1 2$	$P 2_1 2_1 2$
Razlučivanje / Å	20,74 – 2,50 (2,64 – 2,50)*	20,82 – 2,20 (2,32 – 2,20)
Dimenzije jedinične ćelije		
a, b, c / Å	127,166, 101,133, 50,414	128,092, 101,304, 50,497
α, β, γ / °	90, 90, 90	90, 90, 90
Valna duljina zračenja / Å	1,54056	1,54056
Ukupni broj izmjerenih refleksa	155 514	341 422
Broj nezavisnih refleksa	23 202	34 009
Kompletnost podataka / %	99,8 (100,0)	99,6 (99,4)
Redundantnost	6,7 (5,7)	10,0 (10,1)
R_{meas}	0,130 (0,565)	0,120 (0,549)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	13,8 (3,2)	17,7 (4,5)
Utočnjavanje		
Razlučivanje / Å	20,74 – 2,50	20,41 – 2,20
Broj korištenih refleksa	23 162	33 974
Broj refleksa u probnom skupu	1 156	1 696
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0,1811/0,2315	0,1881/0,2276
Broj nevodikovih atoma proteina	4532	4 545
Broj nevodikovih atoma liganda/ion	62 / 4	54 / 2
Broj molekula vode	162	289
B-faktori / Å ²		
protein	31,62	27,44
ligandi / ioni	27,70/42,55	16,95/23,1
vode	29,43	32,00
Standardna odstupanja od idealnih vrijednosti (rmsd)		
duljine veza / Å	0,010	0,009
vezni kutovi / °	1,10	1,02

Kristali Bj Gly:CP-ligaze 1 su namakani u kristalizacijskoj otopini s glicinom ($c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$) u različitom trajanju (5 min, 30 min, 12 h i 24 h), no niti u jednom aktivnom mjestu se sa sigurnošću ne vidi vezana aminokiselina. Također je pokušana kokristalizacija ligaze s glicinom, ali u mapama elektronske gustoće pri danom razlučivanju (oko $2,5 \text{ \AA}$) nije bilo moguće razlikovati malu aminokiselinu glicin od dvije molekule vode u aktivnom mjestu. Moguće je da glicin u aktivnom mjestu ne tvori stabilne interakcije s ligazom, te je posljedica toga neuređenost glicina u aktivnom mjestu što rezultira teško objašnjivim mapama elektronske gustoće.

Struktura Bj Gly:CP-ligaze 1 s ATP-om (PDB kod 3MEY) je pokazala da se ATP veže u aktivno mjesto u svijenoj konformaciji, na način svojstven aminoacil-tRNA-sintetazama razreda II (slika 4.8). Adeninski prsten ATP-a je uglavljen između bočnih ogranka Arg286 i Phe172 koji su visoko konzervirani i čine dio motiva 2 i 3. Prsten je dodatno stabiliziran izrazito konzerviranim bočnim ogrankom Glu161 i karbonilnim kisikom Leu169 koji je kod mMbSerRS zamijenjen s Val348. Ribozni dio ATP-a je stabiliziran vodikovim vezama između 2'-OH skupine i karbonilnih kisika Ala250 i Cys251. 3'-OH skupina riboze ostvaruje interakciju s Glu237 preko molekule vode. Negativno nabijeni trifosfatni dio stabiliziran je ionom magnezija, bočnim ograncima Arg159, Arg168 i Arg286, te bočnim ogrankom Lys235. Ion magnezija je koordiniran kisikovim atomima β - i γ -fosfata te četiri molekule vode (slika 4.8).

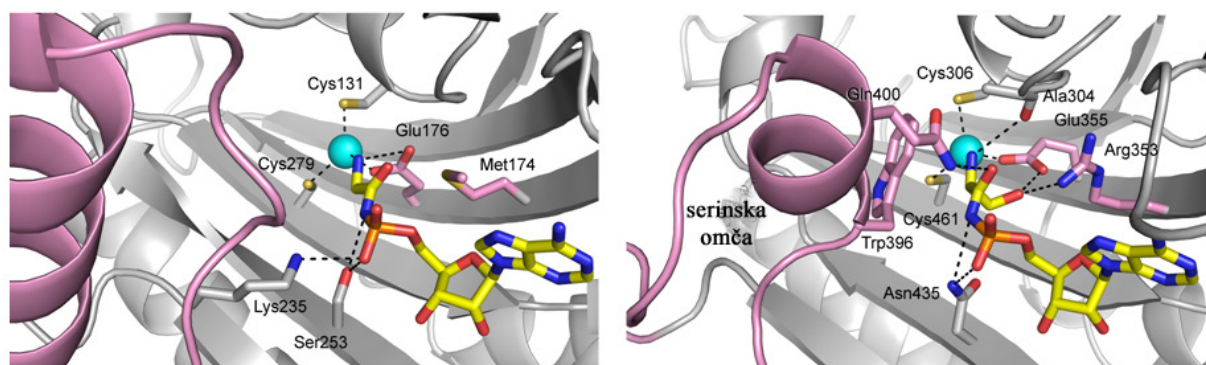


Slika 4.8. **A** Molekula ATP-a (štapići) vezana u aktivnom mjestu Bj Gly:CP-ligaze 1 (sivo). Zeleno je prikazana diferencijalna mapa $F_o - F_c$ (razlučivanje $2,5 \text{ \AA}$, na razini $3,0 \sigma$) izračunata bez prisustva ATP-a i Mg^{2+} . Zn^{2+} je prikazan u obliku plave, a Mg^{2+} u obliku tamno sive kuglice. **B** Shematski prikaz interakcija između ATP-a i Bj Gly:CP-ligaze 1.

4.5 Vezanje analoga glicil-adenilata u aktivno mjesto Bj Gly:CP-ligaze 1

Kristalna struktura kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 s analogom glicil-adenilata (5'-*O*-(*N*-glicil-sulfamoil) adenozin, skraćeno GlyAMS) u aktivnom mjestu (PDB kod 3MF1) je pružila uvid u način vezanja glicina i smještanje intermedijera u aktivno mjesto ligaze. Adenozinski dio GlyAMS-a ostvaruje istu mrežu interakcija s ligazom kao odgovarajući dio u strukturi s ATP-om (slika 4.9). Amino-skupina glicinskog dijela analoga zamjenjuje molekulu vode koja koordinira cinkov ion, pri čemu je koordinacija cinka ostala nepromijenjena. Amino-skupina glicina je dodatno stabilizirana vodikovom vezom s Glu176 koja također koordinira cink. Kod mMbSerRS, Glu355 koja sudjeluje u koordinaciji cinkovog iona stabilizira bočnu hidroksilnu skupinu serina i drugačije je orijentirana u usporedbi s ligazom (slika 4.9). Arg353, koji u mMbSerRS pravilno orijentira hidroksilnu skupinu serina je kod ligaze zamijenjen konzerviranim Met174 koji ne stvara direktnu interakciju s glicinskim dijelom GlyAMS-a. Nedostatak interakcija koje osiguravaju pravilno smještanje serina u aktivnom mjestu je jedan od mogućih razloga nemogućnosti ligaze da prepozna serin, te promjene specifičnosti prema glicinu.

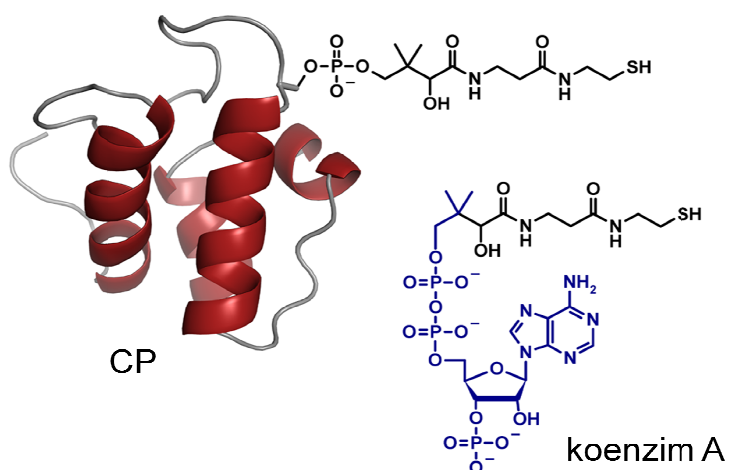
Za razliku od mMbSerRS, kod Bj Gly:CP-ligaze 1 nije primijećena nikakva značajnija konformacijska promjena prouzročena uslijed vezanja analoga glicil-adenilata. „Serinska omča“ (aminokiseline 394-410), koja se formira vezanjem serina u aktivno mjesto mMbSerRS, kod ligaze je zamijenjena dugom omčom iza koje slijedi α -zavojnica (aminokiseline 213-232). Kod ligaze je ta regija smještena podalje od aktivnog mjesta i nema utjecaja na vezanje glicina (slika 4.9).



Slika 4.9. Usporedba aktivnih mjesta Bj Gly:CP-ligaze (A) i mMbSerRS (B) s analogima aminoacil-adenilata u aktivnom mjestu (prikazani poput žutih štapića). Zn^{2+} je prikazan u obliku plave kuglice, dok su aminokiseline aktivnog mjesta koje koordiniraju cink i adenilate prikazane u obliku štapića. Omča-zavojnica motiv kod ligaze i serinska omča kod mMbSerRS istaknute su ljubičasto.

4.6 Struktura Bj Gly:CP-ligaze 1 u kompleksu s koenzimom A

Bj Gly:CP-ligaza 1 tioesterski veže aktiviranu aminokiselinu glicin na 4'-fosfopanteteinsku skupinu odgovarajućeg protein-nosača⁸. Da bi se dobio uvid u vezanje prostetičke skupine u aktivno mjesto ligaze, kristali su namakani 3-5 h u kristalizacijskoj otopini koja je sadržavala koenzim A ($c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$), glicin ($c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$), ATP ($c = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$) i MgCl_2 ($c = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$). Koenzim A strukturno nalikuje prostetičkoj skupini protein-nosača (slika 4.10), te je pokazano kako može poslužiti kao analog protein-nosača u reakciji aminoacilacije. Zbog tog je razloga korišten za proučavanje vezanja 4'-fosfopanteteina u aktivno mjesto ligaze. Namakani kristal je ohlađen u tekućem dušiku te snimljen na Xcalibur Nova R difraktometru. Dobiveni skup eksperimentalnih podataka je obrađen programima CrysAlis, te Scala i Truncate (dio paketa CCP4). Eksperimentalni podaci su navedeni u tablici 4.4. Za modeliranje supstrata u aktivno mjesto je korišten program Coot, te *Phenix.refine* za utočnjavanje modela (PDB kod 3PZC).

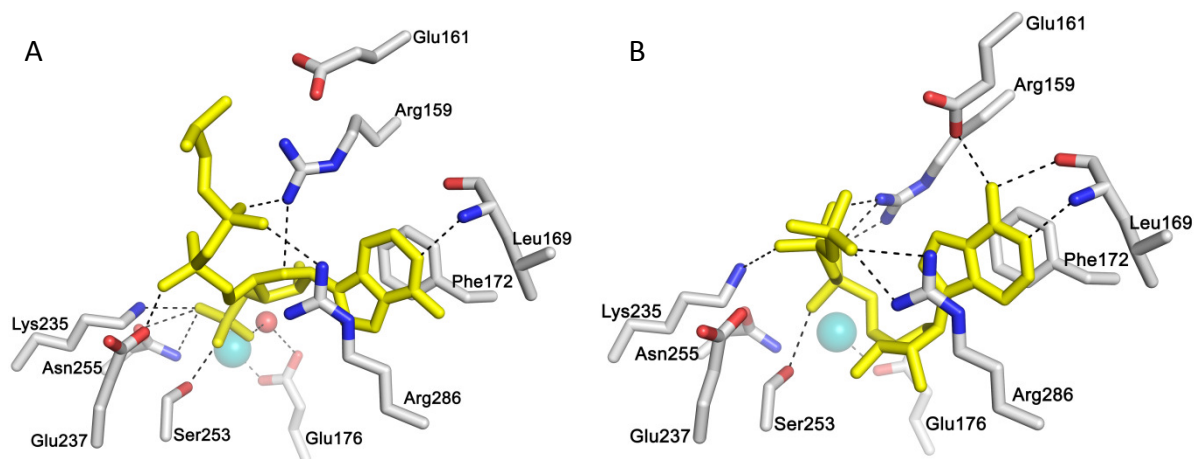


Slika 4.10. Shematski prikaz protein-nosača (CP), prirodnog supstrata aa:CP-ligaza i koenzima A koji djeluje kao analog protein-nosača.

Tablica 4.4. Statistika snimanja podataka kristala te točnosti modela Bj Gly:CP-ligaze 1 u kompleksu s ATP-om i CoA. * Vrijednosti u zagradama odnose se na ljusku s najvećim razlučivanjem.

	Bj Gly:CP-ligaza 1 + koenzim A	<i>Utočnjavanje</i>	
PDB kod	3PZC	Razlučivanje / Å	20,86-2,20
Prostorna grupa	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2	Broj korištenih refleksa	32 404
Razlučivanje / Å	20,86-2,20(2,32-2,20)*	Broj refleksa u probnom skupu	1 719
Dimenzije jedinične ćelije		$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0,167/0,223
<i>a, b, c</i> / Å	128,19, 101,79, 50,62	Broj nevodikovih atoma proteina	4 585
α, β, γ / °	90, 90, 90	Broj nevodikovih atoma liganda/iona	60 / 2
Valna duljina zračenja / Å	1,54056	Broj molekula vode	322
Ukupni broj izmjerenih refleksa	170 411	B-faktori / Å ²	
Broj nezavisnih refleksa	34 431	protein	20,78
Kompletnost podataka / %	99,8 (99,9)	ligandi / ioni	35,00/23,95
Redundantnost	4,9 (3,2)	vode	30,49
R_{meas}	0,075 (0,444)	Standardna odstupanja od idealnih vrijednosti (rmsd)	
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	15,7 (2,7)	duljine veza / Å	0,007
		vezni kutovi / °	1,041

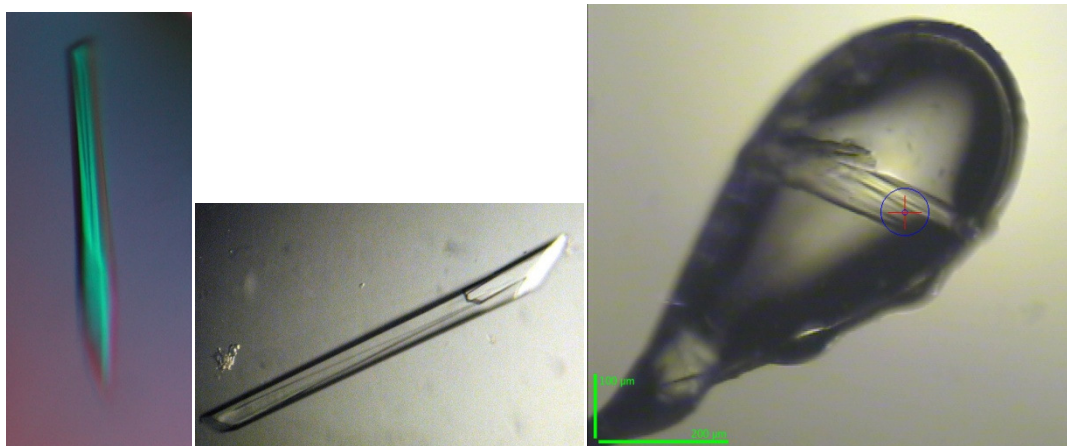
Vežanje koenzima A nije uzrokovalo nikakve značajne konformacijske promjene kod ligaze (rmsd C^α atoma je 0,26 Å). Samo u jednom aktivnom mjestu homodimera je nađena diferencijalna elektronska gustoća koja odgovara dijelu koenzima A (slika 4.11). U drugom aktivnom mjestu je nađen glicil-adenilat, prirodni intermedijer reakcije. Molekula koenzima A se smjestila u dijelu aktivnog mjesta u koji se inače veže ATP ili glicil-adenilat, no na značajno drugačiji način (slika 4.11). U usporedbi s načinom vezanja ATP-a, adeninski prsten CoA veže se u obrnutoj orijentaciji, pri čemu je i dalje uglavljen između bočnih ogranaka Phe172 i Arg286. Adeninski dio CoA formira vodikove veze s Leu169, te preko molekule vode ostvaruje interakcije s Arg173 i Asp285. Ovakav način vezanja adeninskog dijela molekule nije nađen niti u jednoj do sada poznatoj strukturi aaRS razreda II u kompleksu s ATP-om ili aminoacil-adenilatom. Ribozni dio CoA smješten je drugačije u usporedbi s ATP-om pri čemu je fosfatna skupina orijentirana prema cinku (slika 4.11). Fosfatna skupina okružena je sa Ser253, Lys235, Asn255 te Glu176 preko molekule vode. Difosfatni dio CoA je orijentiran na sličan način kao β- i γ- fosfati ATP-a, pri čemu stvara kontakte s Glu237 i argininima 159, 168 i 286. Panteteinski dio koenzima A je neuređen i nije vidljiv u mapama elektronske gustoće. Iako iz strukture nije vidljiv pravilan način vezanja panteteina u aktivno mjesto ligaze, pokazano je da koenzim A, osim što može djelovati kao supstituent protein-nosača, može se i neproduktivno vezati na mjesto ATP-a te djelovati kao njegov analog.



Slika 4.11. **A** Dio molekule koenzima A (žuto) vidljiv u mapama elektronske gustoće u kompleksu s Bj Gly:CP-ligazom 1. **B** molekula ATP-a (žuto) vezana u aktivno mjesto Bj Gly:CP-ligaze 1. Ion cinka označen je kao plava kuglica, dok je molekula vode obojana crveno. Aminokiseline ligaze koje stvaraju interakcije s ligandima prikazane su kao sivi štapići.

4.7 Kristalizacija i određivanje strukture kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 i odgovarajućeg protein-nosača

Kristali protein-protein kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 i Bj CP-a su pripremljeni metodom viseće kapi miješajući 1 μ L pripremljenog kompleksa i 1 μ L otopine za kristalizaciju (0,17 mol dm⁻³ amonijev sulfat, 0,085 mol dm⁻³ natrijev kakodilat pH 6,5, PEG 8K ($w = 25,5\%$) i glicerol (vol. udio 15 %) pri 18 °C. Igličasti kristali kompleksa (slika 4.12) su nastali nakon dva dana, te su ohlađeni u tekućem dušiku.

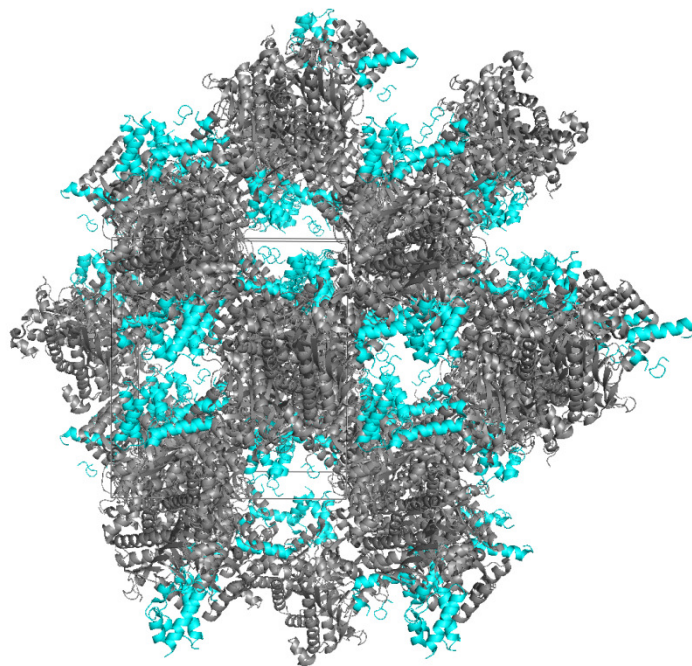


Slika 4.12. Kristali kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 i Bj CP-a veličine oko 0,20 x 0,08 x 0,01 mm.

Kristalografski podaci su sakupljeni na sinkrotronskoj zruci BM14, ESRF (Francuska), te obrađeni pomoću programa XDS. Struktura je riješena metodom molekulske zamjene pomoću programa EPMR⁷¹, pri čemu je Gly:CP-ligaza (PDB kod 3MF2) s uklonjenim

molekulama vode, ligandima i omča-zavojnica motivom poslužila kao početni model. Struktura kompleksa je izgrađena pomoću programa Buccaneer (dio paketa CCP4). Gotovo sve aminokiseline Bj Gly:CP-ligaze 1 su izgrađene (lanac A: 19-312, lanac B: 18-315). Neki dijelovi protein-nosača su izgrađeni pomoću programa Buccaneer, dok je ostatak izgrađen ručno u programu Coot uz korištenje NMR strukture protein-nosača iz vrste *Agrobacterium tumefaciens* (At CP, PDB kod 2JQ4) kao predloška u izgradnji modela. U konačnom modelu nalaze se dvije molekule protein-nosača, u jednoj su izgrađene aminokiseline 7-80, a u drugoj 34-70. Dijelovi mape elektronske gustoće koji odgovaraju protein-nosačima su znatno lošiji nego za ligazu što ukazuje na njihovu veliku fleksibilnost i neuređenost u kristalu. Jedan od razloga neuređenosti CP-ova je što oni ne stvaraju gotovo nikakve kristalne kontakte (slika 4.13). Prosječni B-faktor svih atoma ligaze je $23,4 \text{ \AA}^2$, dok je za uređeniji CP $78,2 \text{ \AA}^2$ te za manje uređeni $94,8 \text{ \AA}^2$ (izračunato pomoću programa Baverage, CCP4, slika 4.14). Utočnjavanje je provedeno pomoću programa *Phenix.refine*. Točnost modela provjerena je pomoću programa PROCHECK i Molprobity. Eksperimentalni podaci i točnost modela opisani su u tablici 4.5.

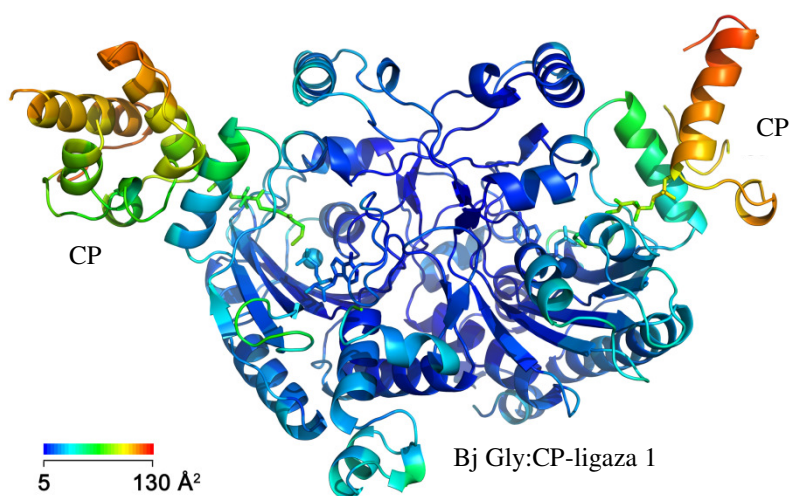
Kako bi se dobila struktura s uređenijim protein-nosačima u kompleksu s Bj Gly:CP-ligazom, napravljen je eksperiment kontrolirane dehidracije kristala (BM14, ESRF). Nažalost, nije primijećen pozitivan utjecaj dehidracije na difrakcijska svojstva kristala kompleksa.



Slika 4.13. Slaganje kompleksa Bj Gly:CP-ligaze (sivo) i Bj CP-a (plavo) u kristalnoj rešetci. Može se primijetiti kako Bj CP ne stvara gotovo nikakve kristalne kontakte već je okrenut prema kanalima ispunjenim molekulama otapala.

Tablica 4.5. Statistika snimanja podataka kristala te točnosti modela Bj Gly:CP-ligaze 1 u kompleksu s Bj CP i malim ligandima. * Vrijednosti u zagradama odnose se na ljusku s najvećim razlučivanjem.

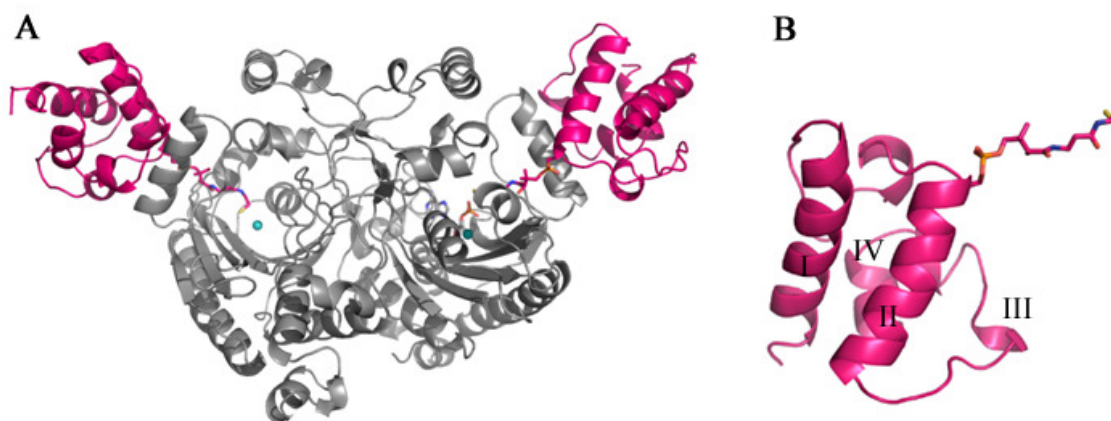
	AMP	GlyAMS	ATP	Gly+ATP
PDB kod	4H2S	4H2T	4H2U	4H2V
Prostorna grupa	$P 2_1 2_1 2_1$	$P 2_1 2_1 2_1$	$P 2_1 2_1 2_1$	$P 2_1 2_1 2_1$
Razlučivanje / Å	46,29-2,15 (2,28-2,15)*	46,48-2,45 (2,59-2,44)	46,32-2,10 (2,10-2,22)	46,38-2,00 (2,12-2,00)
Dimenzije jedinične ćelije				
a, b, c / Å	92,05, 101,68, 103,98	91,46, 101,22, 104,65	90,71, 100,90, 104,27	90,85, 101,02, 104,41
α, β, γ / °	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Valna duljina zračenja / Å	1,00512	0,95373	0,95373	0,95373
Ukupni broj izmjerenih refleksa	400 193	268 722	410 494	481 798
Broj nezavisnih refleksa	53 846	36 622	56 606	65 488
Kompletnost podataka / %	99,9 (99,7)	99,7 (98,6)	99,7 (98,4)	99,5 (97,5)
Redundantnost	7,4 (7,4)	7,3 (7,3)	7,2 (7,3)	7,4 (7,3)
R_{meas} / %	8,1 (56,7)	9,6 (63,4)	6,8 (53,3)	6,5 (51,0)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	22,9 (4,2)	20,8 (3,5)	22,4 (4,4)	22,8 (4,6)
Utočnjavanje				
Razlučivanje / Å	2,15	2,44	2,10	2,00
Broj korištenih refleksa	53 840	36 621	56 602	65 482
Broj refleksa u probnom skupu	2 692	1 833	2 833	3 296
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0,171/0,207	0,178/0,217	0,175/0,209	0,179/0,210
Broj nevodikovih atoma proteina	5 453	5 270	5 397	5 374
Broj nevodikovih atoma liganda/iona	92/2	96/12	108/9	110/17
Broj molekula vode	418	215	339	337
B-faktori / Å ²				
protein	54,94	53,96	57,10	56,54
ligandi / ioni	42,34/23,16	38,31/22,72	45,68/40,33	41,42/30,51
vode	30,86	21,51	35,53	31,21
Standardna odstupanja od idealnih vrijednosti (rmsd)				
duljine veza / Å	0,008	0,008	0,007	0,007
vezni kutovi / °	1,047	1,128	1,105	1,045



Slika 4.14. Struktura kompleksa Bj Gly:CP-ligaze i Bj CP-a obojana prema B-faktorima. Ppant i AMP prikazani su kao štapići, ion cinka kao kuglica.

4.8 Kompleks Bj Gly:CP-ligaze 1 i Bj CP-a otkriva mjesto vezanja dvaju proteina

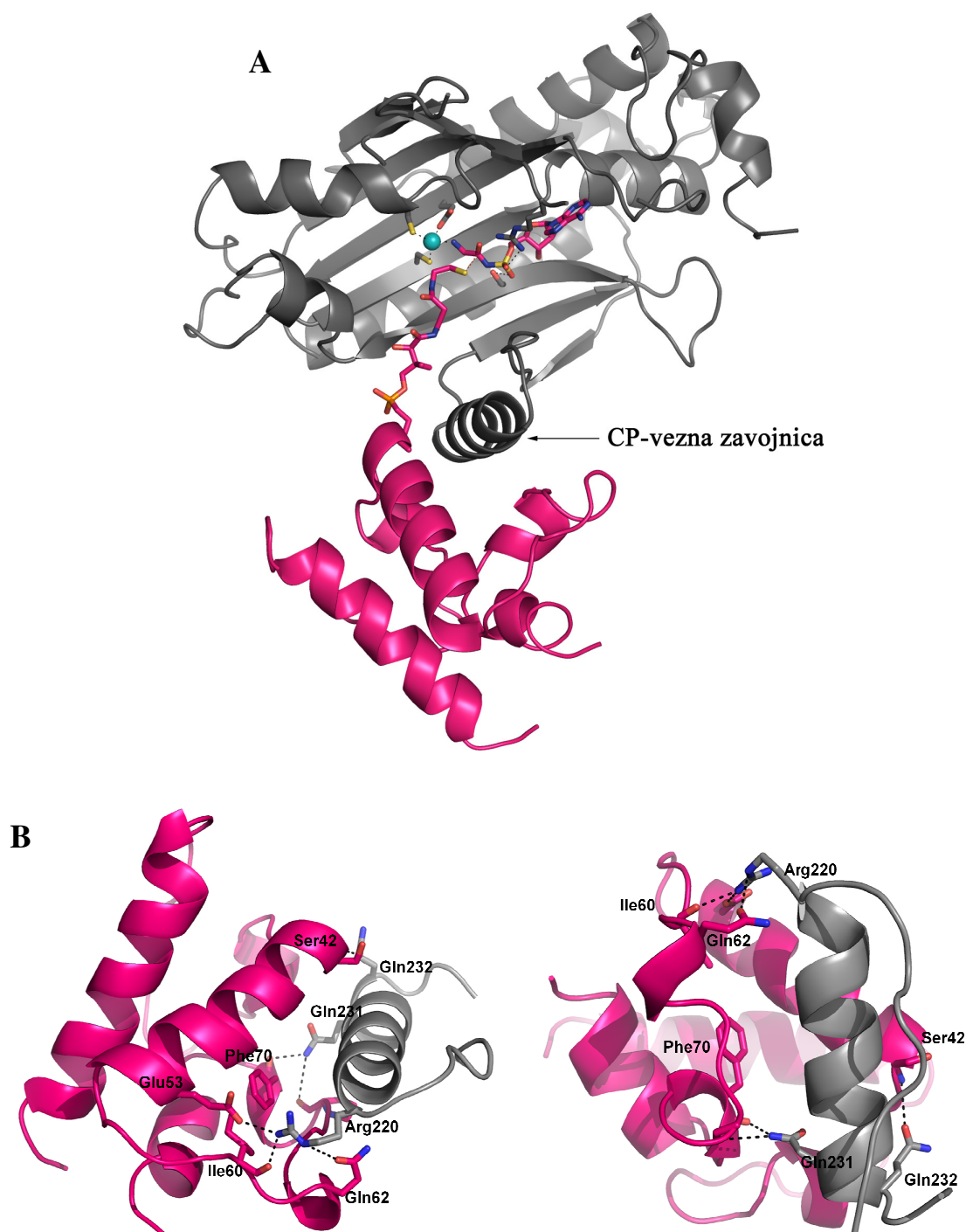
Kristalna struktura kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 i odgovarajućeg protein-nosača je otkrila mjesto vezanja i način prepoznavanja ovih dvaju proteina. U asimetričnoj jedinici kristala se nalazi jedna molekula Bj Gly:CP-ligaze 1 na koju su vezana dva protein-nosača, svaki na jednu podjedinicu ligaze (slika 4.15A). Struktura ligaze u kompleksu gotovo je identična strukturi same ligaze (rmsd C^α atoma iznosi 0,49 Å). Protein-nosači imaju strukturu svojstvenu prethodno poznatim strukturama acil-protein-nosača.⁶² Bj CP je mali protein od 90 aminokiselina koji na bočnoj skupini visoko konzerviranog serina (Ser42) ima kovalentno vezanu prostetičku ruku (4'-fosfopantetein, Ppant). Građen je od tri veće i jedne manje α -zavojnice koje čine oblik klupka, pri čemu je Ser42 smješten na početku druge veće α -zavojnice (slika 4.15B). Kao i u strukturi nenamakane Bj Gly:CP-ligaze 1, i u nenamakanom kompleksu je nađena po jedna molekula AMP-a u aktivnom mjestu.

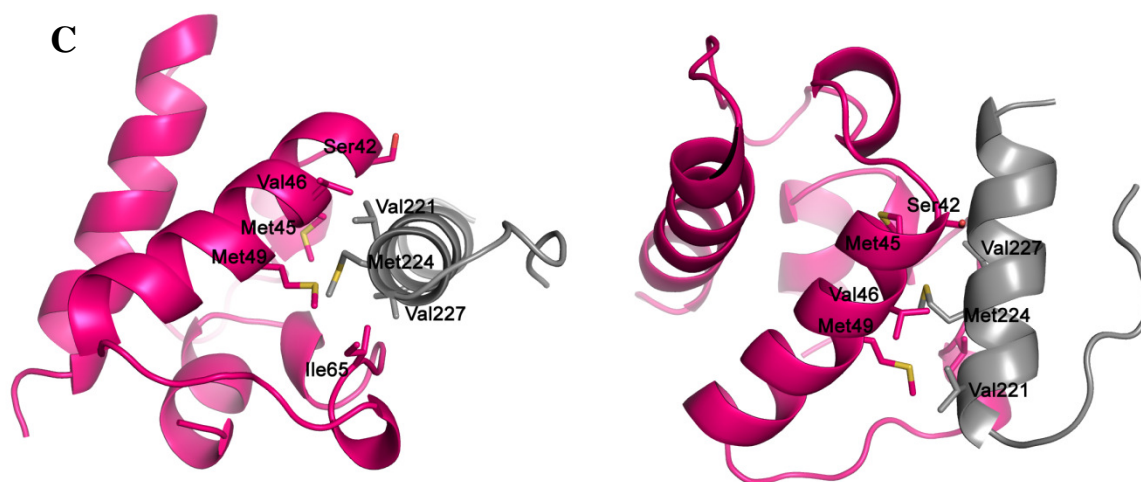


Slika 4.15. **A** Struktura kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 (sivo) i Bj CP-a (ružičasto). **B** Struktura Bj CP-a s označenim α -zavojnicama karakteristična za protein-nosače. Prostetička skupina prikazana je u obliku štapića, Zn^{2+} kao plava kuglica.

Protein-nosač se veže na ligazu stvarajući interakcije s karakterističnom α -zavojnicom ligaze, koja je stoga nazvana CP-vezna zavojnica. Kao dio omča-zavojnica motiva smještena je dalje od aktivnog mjesta i vrlo je izložena otapalu. Iz strukture je razvidno kako Bj CP ostvaruje interakciju s ligazom isključivo preko CP-vezne zavojnice (slika 4.16A). Međupovršina između ligaze i CP-a iznosi oko 650 Å², što predstavlja oko 13,2 % slobodne površine CP-a i 4,5 % površine ligaze (izračunato pomoću servera PISA, http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot_int/pistart.html).⁸² Protein-nosač se veže na CP-veznu zavojnicu

gotovo isključivo preko hidrofobnih interakcija. Nađene su samo dvije moguće vodikove veze, na krajevima CP-vezne zavojnice koji su najizloženiji otapalu u kompleksu. Između bočnog ogranka Arg220 ligaze i karbonilnog kisika Ile60 i bočnog ogranka Glu53 CP-a (slika 4.16B). Druga moguća vodikova veza ostvaruje se preko Gln231 ligaze i Pro67 i Phe70 CP-a. Hidrofobne interakcije u kompleksu uključuju Met224 ligaze koji je uglavljen između dva metionina CP-a (Met45 i Met49, slika 4.16C). Dodatne hidrofobne interakcije uključuju Val221 ligaze i Val46 CP-a, te Val227 ligaze i Ile65 CP-a.





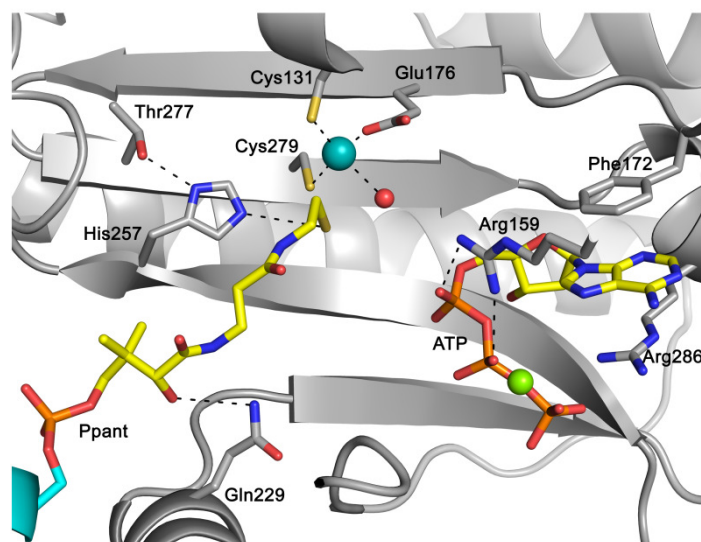
Slika 4.16. **A** Interakcija Bj Gly:CP-ligaze 1 (sivo) i Bj CP-a (ružičasto) preko CP-vezne zavojnice. **B** Polarne interakcije i **C** hidrofobne interakcije između ligaze i Bj CP-a gledano odozgo (lijevi panel) i sa strane (desni panel). Aminokiseline koje sudjeluju u interakciji prikazane su kao štapići.

4'-fosfopanteteinska ruka (Ppant) ulazi duboko u aktivno mjesto ligaze, dolazeći pritom u blizinu cinkovog iona i molekule AMP-a (slika 4.16A). Tunel kroz koji prolazi prostetička skupina smješten je između omča-zavojnica motiva i katalitičkog dijela ligaze, te je karakterističan samo za aa:CP-ligaze. Fosfatna skupina Ppant-a je stabilizirana bočnim ogrankom Gln232 ligaze. Uočeno je nekoliko mogućih vodikovih veza između ligaze i Ppant ruke: između tiolne skupine i His257, pantoilnog karbonilnog kisika i bočnog ogranka Gln229, β -alanilnog karbonilnog kisika i bočnog ogranka Tyr132. Unatoč tome, elektronska gustoća za panteteinski dio ruke je slabije definirana od elektronske gustoće ligaze što ukazuje na njezinu fleksibilnost. Prosječni B-faktor Ppant skupine je $62,1 \text{ \AA}^2$, što je znatno više od okolnih bočnih skupina ligaze koje je okružuju ($23,1 \text{ \AA}^2$), no ipak niže od CP-a ($78,2 \text{ \AA}^2$) što bi moglo ukazivati da vezanje Ppant-a u aktivno mjesto donekle uređuje (stabilizira) ruku u pravilan položaj za reakciju prijenosa aktiviranog glicina s glicil-adenilata na 4'-fosfopantetein.

4.9 Kompleks Bj Gly:CP-ligaze 1 i Bj CP s malim ligandima vezanim u aktivno mjesto

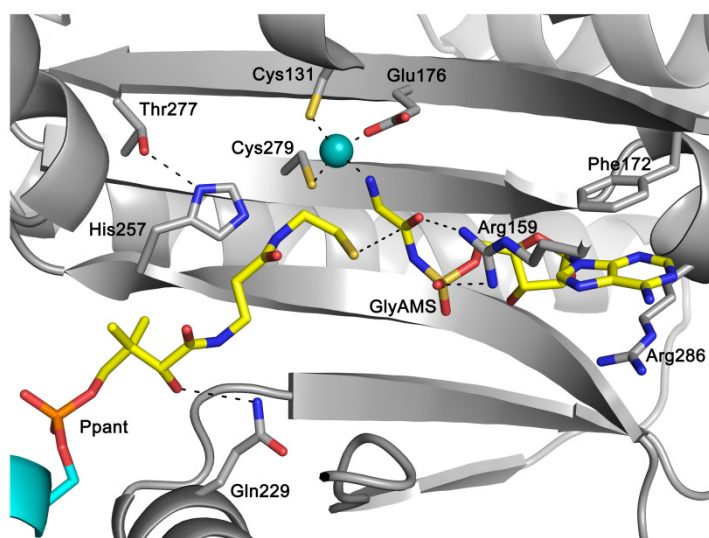
Kristali kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 i Bj CP su namakani u otopinama ATP-a i GlyAMS-a pojedinačno. Eksperimentalni podaci i točnost modela opisani su u tablici 4.5. U strukturi kristala namakanih s ATP-om, u oba aktivna mjesta nađena je po jedna molekula ATP-a u svijenoj konformaciji (slika 4.17). Interakcije koje stabiliziraju ATP u aktivnom mjestu očuvane su i jednake kao u strukturi Gly:CP-ligaze s ATP-om. Struktura kompleksa s

ATP-om je gotovo identična strukturi kompleksa s AMP-om u aktivnom mjestu (C^α rmsd 0,48 Å). Ppant skupina je slično orijentirana kao u strukturi kompleksa s AMP-om (slika 4.17).



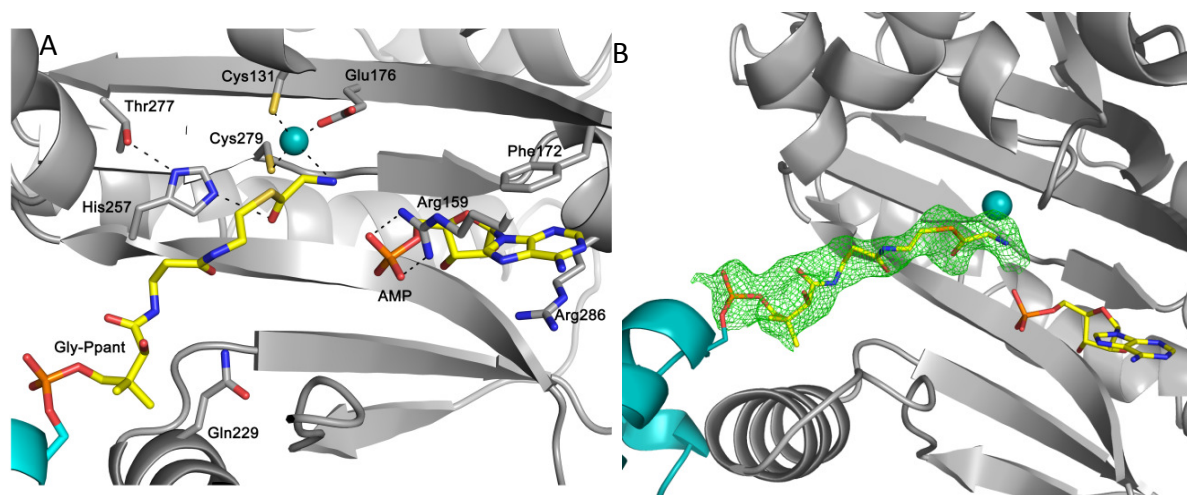
Slika 4.17. Aktivno mjesto Bj Gly:CP-ligaze u kompleksu s Bj CP-om i ATP-om. Aminokiseline ligaze koje interagiraju s ligandima prikazane su kao štapići.

Analog glicil-adenilata (GlyAMS) se smjestio u aktivno mjesto kompleksa na isti način kao u strukturi GlyAMS-a i Gly:CP-ligaze (slika 4.18). Amino-skupina glicinskog dijela analoga je orijentirana prema ionu cinka. Tiolna skupina Ppant-a je u prisustvu GlyAMS-a orijentirana prema karbonilnoj skupini glicina, i smještena u položaj pogodan za nukleofilni napad (slika 4.18).



Slika 4.18. Aktivno mjesto Bj Gly:CP-ligaze u kompleksu s Bj CP-om i GlyAMS-om. Aminokiseline ligaze koje interagiraju s ligandima prikazane su kao štapići.

Kako bi se osigurali svi potrebni supstrati za reakciju aminoacilacije CP-a, kristali kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 i Bj CP-a namakani su u kristalizacijskoj otopini koja je sadržavala ATP, ione magnezija i glicin ($c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$). U jednom aktivnom mjestu je primijećen dio diferencijalne mape elektronske gustoće koji odgovara prostetičkoj skupini CP-a na koju se kovalentno vezao glicin. Kako je prostetička grupa dosta fleksibilna, i mape elektronske gustoće za nju su slabije kvalitete (slika 4.19). Stoga je pomoću programa *Phenix.refine* napravljeno nekoliko vrsta utočnjavanja kako bi se sa što većom sigurnošću utvrdilo nalazi li se u aktivnom mjestu doista produkt reakcije ili samo prostetička skupina. Diferencijalne mape najbolje kvalitete su dobivene nakon nekoliko ciklusa utočnjavanja strukture kompleksa u kojoj su koordinate atoma koji odgovaraju produktu reakcije zadržane ali je parametar zaposjednutosti atoma stavljen na 0, pri čemu je korištena mogućnost da se taj prostor ne tretira kao otapalo (eng. *bulk solvent*). Iako produkt reakcije najbolje odgovara mapama elektronske gustoće, ne može se sa sigurnošću isključiti interpretacija mape kao Ppant i molekula vode ili kao smjesa obje vrste u kristalu.



Slika 4.19. **A** Aktivno mjesto Bj Gly:CP-ligaze u kompleksu s Bj CP-om i Gly-Ppant-om. Aminokiseline ligaze koje interagiraju s ligandima prikazane su kao štapići. **B** Diferencijalna mapa $F_o - F_c$ mapa elektronske gustoće razlučivanja 2,0 Å na razini 3,5 σ i utočnjeni model.

Strukture Bj Gly:CP-ligaze 1 s ligandima u aktivnom mjestu predstavljaju slike koraka katalitičkog ciklusa i pomažu razumijevanju mehanizma reakcije. Glicil-adenilat se veže u aktivno mjesto ligaze na način kao i adenilati aaRS razreda II, te je za pretpostaviti da se prvi korak reakcije, nastajanje stabilnog intermedijera glicil-adenilata iz glicina i ATP-a, odvija istim reakcijskim mehanizmom. Mehanizam prvog koraka reakcije uključuje nukleofilni napad karboksilne skupine glicina na α -fosfat ATP-a. U drugom koraku reakcije dolazi do nukleofilnog napada tiolne skupine fosfopanteteinske ruke na karbonilni ugljikov atom glicil-adenilata pri čemu se formira tioesterska veza. U strukturi kompleksa s GlyAMS-om

prostetička skupina je orijentirana prema pro-*R* kisikovom atomu fosfatne skupine adenilata (slika 4.18), kojemu najvjerojatnije donira proton čime se omogućuje nukleofilni napad. Visokokonzervirani Arg159 i Lys235 doprinose polarizaciji fosfatne skupine i pomažu deprotonaciju nukleofila bez direktnog sudjelovanja aminokiseline enzima kao povoljne baze u mehanizmu reakcije. Ovako predloženi mehanizam drugog koraka reakcije u kojem sam supstrat pokreće reakciju naziva se usklađeni mehanizam potpomognut supstratom.⁸⁶

4.10 Struktura hibridne Gly:CP-ligaze u kompleksu s At CP

Interakcija Bj Gly:CP-ligaze 1 i odgovarajućeg protein-nosača se ostvaruje ponajviše preko CP-vezne zavojnice smještene podalje od aktivnog mjesta. Kako bi se dodatno ispitala važnost spomenute zavojnice u prepoznavanju dvaju proteina dizajnirana je hibridna Gly:CP-ligaza. CP-vezna zavojnica Bj Gly:CP-ligaze 1 (aminokiseline Arg220-Gln232) je zamijenjena odgovarajućom regijom iz At Ala:CP-ligaze. Inače Ala:CP-ligaza kovalentno veže aminokiselinu alanin na odgovarajući protein nosač At CP. Zamjena CP-vezne zavojnice rezultirala je potpunom promjenom u specifičnosti prema protein-nosaču, dok je specifičnost prema aminokiselini ostala nepromijenjena (rezultati dr. sc. Marka Močiboba). Hibridna ligaza tako kovalentno veže glicin na At CP umjesto na Bj CP. Kako bi se razumjele razlike u specifičnosti prema protein-nosačima, kristalizirana je i strukturno okarakterizirana hibridna ligaza u kompleksu s At CP-om.

Kristali kompleksa hibridne ligaze i At CP-a dobiveni su metodom viseće kapi miješajući 1 μL kompleksa i 2 μL kristalizacijske otopine (0,17 mol dm^{-3} amonijev acetat, 0,085 mol dm^{-3} natrijev citrat dihidrat pH 5,6, PEG 4K ($w = 10\%$), PEG 8K ($w = 10\%$) i glicerol (vol. udio 15 %)), slika 4.20. Potpuni set podataka razlučivanja 1,95 Å snimljen je na sinkrotronskoj zruci BM14, ESRF (Grenoble). Struktura je riješena metodom molekulske zamjene pri čemu je kao model poslužila struktura Bj Gly:CP-ligaze 1 (PDB kod 3MF2) s izostavljenom CP-veznom zavojnicom, ligandima i molekulama vode. Eksperimentalni podaci i točnost modela opisani su u tablici 4.6.



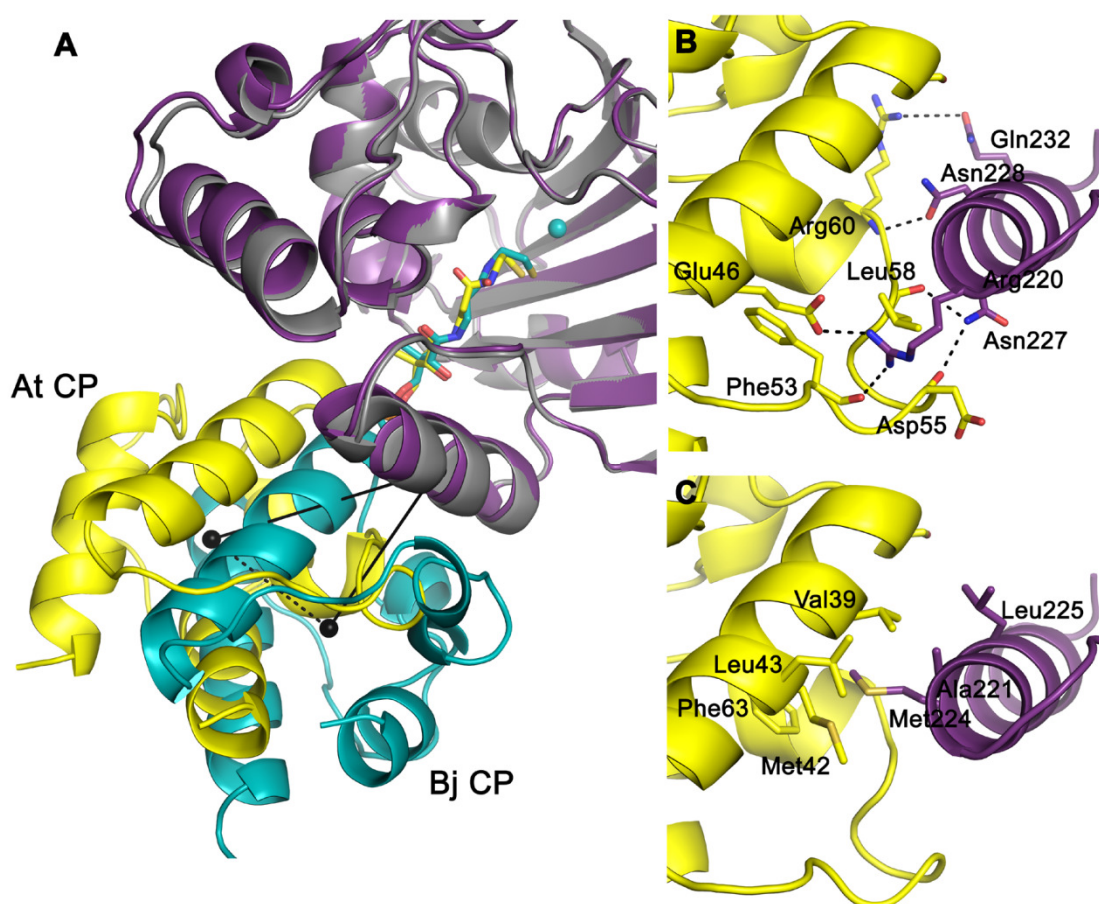
Slika 4.20. Kristali kompleksa hibridne Gly:CP-ligaze i At CP-a veličine otprilike 0,8x0,2x0,1 mm.

Tablica 4.6. Statistika snimanja podataka kristala te točnosti modela Bj Gly:CP-ligaze 1 u kompleksu s Bj CP i malim ligandima. * Vrijednosti u zagradama se odnose na ljusku s najvećim razlučivanjem.

	AMP	GlyAMS	ATP
PDB kod	4H2W	4H2X	4H2Y
Prostorna grupa	$P 2_1 2_1 2_1$	$P 2_1 2_1 2_1$	$P 2_1 2_1 2_1$
Razlučivanje / Å	45,76-1,95 (2,06-1,95)*	45,94-2,15 (2,28-2,15)	46,09-2,10 (2,10-2,23)
Dimenzije jedinične ćelije			
a, b, c / Å	99,70, 101,25, 103,00	99,57, 101,43, 103,04	99,86, 101,59, 103,42
α, β, γ / °	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Valna duljina snimanja / Å	0,95372	1,28215	0,95372
Ukupni broj izmjerenih refleksa	611 576	740 060	379 057
Broj nezavisnih refleksa	76 788	57 632	62 053
Kompletnost podataka / %	99,3 (96,2)	99,7 (98,5)	99,8 (99,5)
Redundantnost	8,0 (8,0)	12,8 (11,0)	6,1 (6,1)
R_{meas} / %	7,3 (52,3)	5,8 (45,7)	7,9 (69,3)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	24,3 (5,6)	31,3 (5,1)	18,4 (3,1)
Utočnjavanje			
Razlučivanje / Å	1,95	2,15	2,10
Broj korištenih refleksa	76 469	57 625	62 041
Broj refleksa u probnom skupu	3 823	2 878	3 101
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0,172/0,196	0,167/0,198	0,176/0,210
Broj nevodikovih atoma proteina	5 840	5 797	5 608
Broj nevodikovih atoma liganda/ion	89/3	96/3	104/3
Broj molekula vode	370	347	371
B-faktori / Å ²			
protein	49,28	57,17	57,73
ligandi / ioni	38,25/24,42	47,58/40,48	50,53/43,71
vode	31,67	39,26	34,70
Standardna odstupanja od idealnih vrijednosti (rmsd)			
duljine veza / Å	0,008	0,008	0,007
vezni kutovi / °	1,074	1,062	1,068

Usporedba kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 s Bj CP i hibridne Gly:CP-ligaze s At CP pruža detaljan uvid u prepoznavanje i razlikovanje protein-nosača. Struktura samih ligaza vrlo je slična (C^α rmsd 0,39 Å), pri čemu je CP-vezna zavojnica orijentirana na isti način. Također,

strukture Bj i At protein-nosača su slične (C^α rmsd 1,1 Å) unatoč niskom postotku sličnosti na razini aminokiselinske sekvence (27 %). No, unatoč visokoj sličnosti struktura ligaza i CP-ova, način vezanja CP-ova bitno se razlikuje (slika 4.21A). Računajući centre mase CP-ova pomoću CALCOM programa⁸⁷, At CP je pomaknut u odnosu na Bj CP za oko 9 Å prema tunelu u koji ulazi prostetička ruka, te je zakrenut oko 37° oko osi CP-vezne zavojnice. At CP se smješta bliže prema katalitičkoj domeni hibridne ligaze i motivu HTH. No, iako se dva protein-nosača vežu na drugačiji način na ligaze i njihovi serini na koje su kovalentno vezane prostetičke ruke (Ser42 i Ser35) su također pomaknuti, položena prostetička ruka dolazi na isto mjesto u tunel, pri čemu je fosfatna skupina ruke jednako smještena u oba slučaja (slika 4.21A).

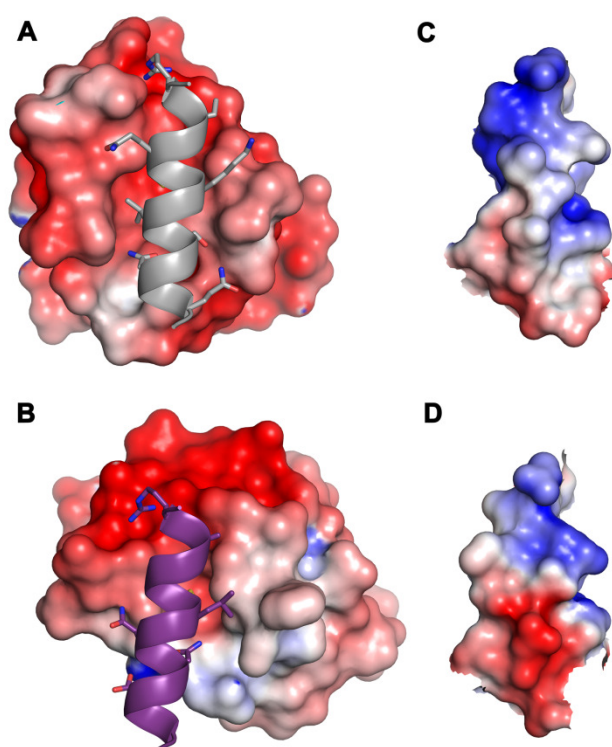


Slika 4.21. A Preklopljeni kompleks Bj Gly:CP-ligaze 1 (sivo) i Bj CP-a (plavo) na kompleks hibridne Gly:CP-ligaze (ljubičasto) i At CP (žuto). Centri mase CP-ova prikazani su kao crna kuglica. B, C Međupovršina hibridne Gly:CP-ligaze (ljubičasto) i At CP-a (žuto). Aminokiseline uključene u polarne (B) i hidrofobne (C) interakcije prikazane su kao štapići.

Dodirna površina hibridne Gly:CP-ligaze i At CP-a znatno se razlikuje od one nađene u strukturi kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 i Bj CP-a. Potencijalne vodikove veze između bočnog ogranka Arg220 ligaze i Glu46 te Phe53 At CP-a su očuvane (slika 4.21B). No primijećene su nove moguće vodikove veze između Asn227 ligaze i Asp55 i Leu58 CP-a, te

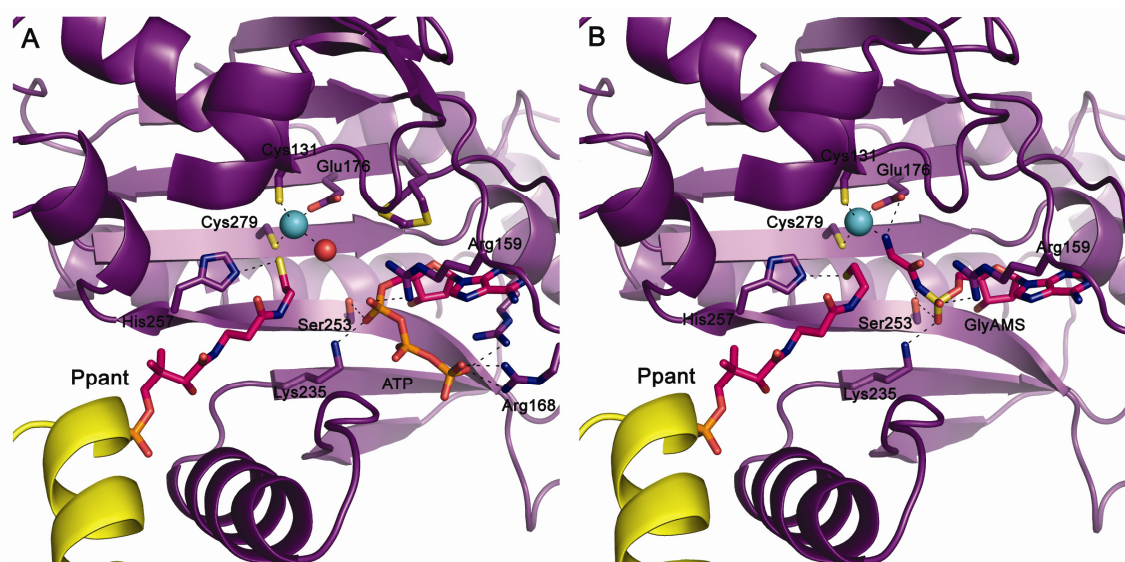
Asn228 i Gln232 ligaze s Arg60. Ove elektrostatske interakcije okružuju hidrofobnu međupovršinsku jezgru (slika 4.21C).

Uspoređujući površine dviju CP-veznih zavojnica (slika 4.22), može se primijetiti kako je N-kraj zavojnice pozitivno nabijen i slično oblikovan kod obje ligaze zbog konzerviranog Arg220 (naboj površina izračunat je pomoću programa APBS). No, hidrofobni dio u sredini zavojnica je drugačije oblikovan i orijentiran. Najveće razlike između CP-veznih zavojnica se mogu uočiti u području C-kraja, koji je kod At CP-vezne zavojnice negativno nabijen, dok je kod Bj izraženiji hidrofobni karakter. Upravo se ti dijelovi nameću kao glavne karakteristike ligaza bitne za raspoznavanje odgovarajućeg protein-nosača.



Slika 4.22. Elektrostatski nabijene površine Bj CP-a (A), At CP-a (B), Bj CP-vezne zavojnice (C) i At-vezne zavojnice (D) izračunate pomoću APBS servera⁸⁸. Gornji dijelovi zavojnica odgovaraju njihovom N-kraju.

Kristali kompleksa hibridne Gly:CP-ligaze i At CP-a su također namakani u otopinama ATP-a i GlyAMS-a. Strukture su potvrdile da je način njihova vezanja u aktivno mjesto jednak kao i u slučaju Bj Gly:CP-ligaze (slika 4.23). Jednak način smještanja ovih liganada u aktivno mjesto potvrdio je da CP-vezna zavojnica ne utječe na prvi korak reakcije, već isključivo na prepoznavanje i vezanje odgovarajućeg CP-a.



Slika 4.23. Vezanje ATP-a (**A**) i GlyAMS-a (**B**) u aktivno mjesto hibridne Gly:CP-ligaze (ljubičasto) kompleksirane s At CP-om (žuto). Ppant, ATP i GlyAMS prikazani su kao ružičasti štapići, Zn^{2+} kao plava kuglica, te aminokiseline koje koordiniraju Zn^{2+} i bitne su za vezanje liganada prikazane su kao štapići.

5 RASPRAVA

5.1 Selektivnost aa:CP-ligaza prema odgovarajućoj aminokiselini

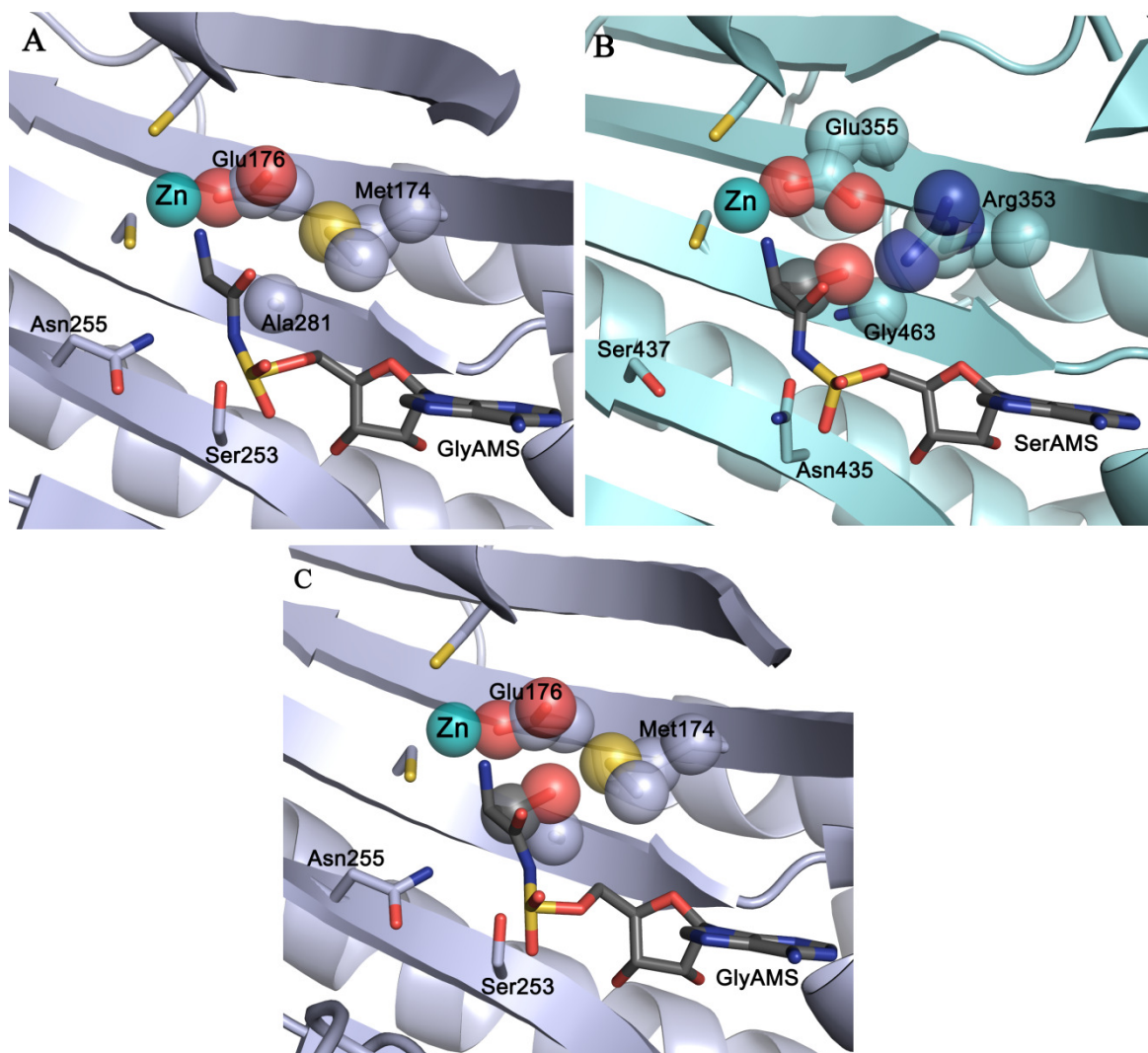
Aminokiselina:[protein-nosač]-ligaze su prvi put primijećene pretraživanjem aminokiselinskih sekvenci sličnih metanogenom tipu seril-tRNA-sintetaza. Već je sama promjena specifičnosti aa:CP-ligaza prema aminokiselini bila neočekivana, jer je poznato da je aktivacija pripadne aminokiseline kod aaRS evolucijski strogo očuvana.⁸⁹ Dok Gly:CP-ligaza veže glicin, Ala:CP-ligaza preferira alanin nad serinom i glicinom. Iako ovim krnjim homolozima SerRS metanogenog tipa nedostaje tRNA-vezna domena, analiza i usporedbe struktura potvrdile su da se radi o visokoj strukturnoj i sekvencijskoj očuvanosti aktivnih mjesta mSerRS i aa:CP-ligaza. Dodatno je zanimljivo da su detaljne kinetičke analize pokazale da aa:CP-ligaze selektiraju aminokiseline s manjom specifičnošću nego mSerRS. mMbSerRS misaktivira treonin oko 3 450 puta slabije od serina⁷, dok Bj Gly:CP-ligaza 1 katalizira aktivaciju alanina oko 300 puta slabije od glicina (tablica 5.1). Još relaksiranija specifičnost primijećena je kod At Ala:CP-ligaze, koja preferira alanin nad glicinom ili serinom svega 30 - 40 puta. Slabija mogućnost raspoznavanja alanina od glicina ili serina primijećena je i kod aaRS, ali su one tijekom svoje duge evolucije razvile posebne mehanizme ispravljanja krivo vezane aminokiseline. Tako je AlaRS tRNA-sintetaza koja uz postojeću domenu za popravak ima i posebno eksprimiran odvojeni homolog te domene (AlaXps) koji hidrolizira krivo aciliranu Ser-tRNA^{Ala} u stanici.¹²

Tablica 5.1. Kinetički parametri aktivacije aminokiselina određeni ATP/PP_i izmjenom.^{7,8}

		$K_M / \text{mmol dm}^{-3}$	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}}/K_M / \text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$	$1 / (k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{relativan}}$
Bj Gly:CP-ligaza 1	Gly	$0,93 \pm 0,09$	$1,5 \pm 0,1$	$1\,680 \pm 220$	1
	Ala	25 ± 4	$0,14 \pm 0,02$	$5,4 \pm 0,2$	311
Bj Gly:CP-ligaza 2	Gly	$0,58 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,08$	$1\,731 \pm 73$	1
	Ala	14 ± 2	$0,075 \pm 0,03$	$5,6 \pm 0,4$	309
At Ala:CP-ligaza	Ala	$0,24 \pm 0,04$	$2,3 \pm 0,3$	$10\,200 \pm 1\,900$	1
	Gly	$5,7 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,1$	373 ± 14	44
	Ser	$5,6 \pm 1,0$	$1,15 \pm 0,05$	234 ± 51	27
mMbSerRS	Ser	$0,104 \pm 0,27$	$1,7 \pm 0,1$	$16\,400 \pm 3\,000$	1
	Thr	65 ± 19	$0,3 \pm 0,03$	$4,7 \pm 1,5$	3450

Usporedbom trodimenzijskih struktura aktivnog mjesta mMbSerRS i Bj Gly:CP-ligaze 1 s analozima aminoacil-adenilata (SerAMS i GlyAMS) može se naslutiti kako Bj Gly:CP-ligaza 1 razlikuje glicin od serina (slika 5.1). Iako su aminokiseline koje koordiniraju cinkov ion u aktivnom mjestu očuvane, bočna skupina glutaminske kiseline je kod ligaze u drugačijoj

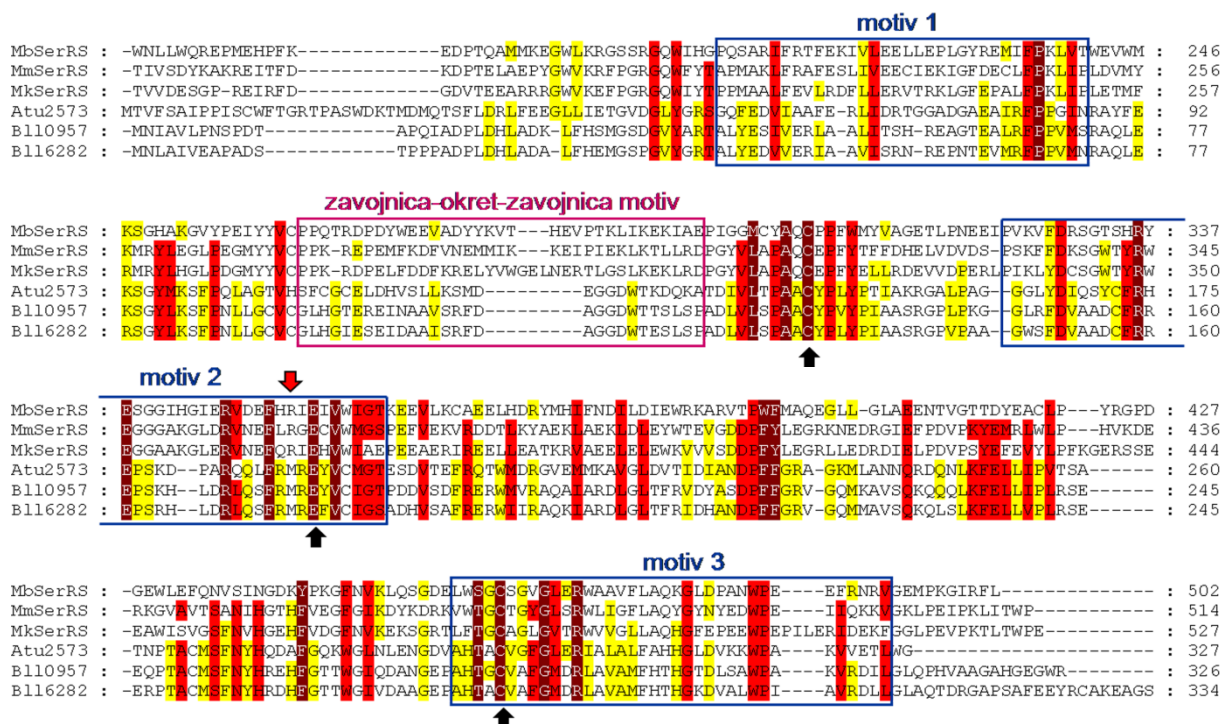
konformaciji pri čemu ujedno ostvaruje interakciju s amino skupinom glicina (slika 4.9A). Kod mMbSerRS bočna skupina glutaminske kiseline je zakrenuta i jednom hidroksilnom skupinom orijentirana prema bočnoj skupini supstrata serina.



Slika 5.1. Usporedba aktivnih mjesta Bj Gly:CP-ligaze 1 i mMbSerRS. **A** Bj Gly:CP-ligaza 1 s GlyAMS-om, **B** mMbSerRS sa SerAMS-om i **C** model Bj Gly:CP-ligaza sa SerAMS-om dobiven preklapanjem struktura enzima. Štapićima su prikazane aminokiseline aktivnog mjesta. Ion cinka označen je kao kuglica. Aminokiselinski ogranci bitni za razlikovanje supstrata i bočna skupina serina u SerAMS-u dodatno su prikazani kao kuglice.

Dodatnu interakciju s bočnom skupinom serina kod mMbSerRS ostvaruje i bočni ogranak Arg353 (slika 5.1B). Pretpostavlja se da su upravo vodikove veze Glu355 i Arg353 s bočnom skupinom serina odgovorne za negativnu selekciju mMbSerRS prema manjim aminokiselinama, jer ne mogu ostvarivati te interakcije.⁷ Kod Bj Gly:CP-ligaze 1 Arg353 je zamijenjen s Met174 čija je bočna skupina postavljena tako da sterički sprečava smještanje hidroksilne skupine serina u aktivno mjesto. Pri tome metionin kao vrlo hidrofobna aminokiselina onemogućuje pravilnu orijentaciju hidrofilne bočne skupine serina, a samim

time i položaj aminokiseline za povoljan nukleofilni napad karboksilne skupine na α -fosfatnu grupu ATP-a (slika 5.1C). Navedeni sterički razlozi kao i velika razlika u hidrofobnosti ukazuju da je Met174 jedna od aminokiselina izrazito odgovornih za diskriminaciju serina kod Gly:CP-ligaze te za smještanje malih alifatskih aminokiselina u aktivno mjesto. U prilog tome ide i činjenica da je kod metanogenih sintetaza Arg353 očuvan, za razliku od ligaza kod kojih je očuvan upravo metionin (slika 5.2). Dodatna potvrda ovoj tvrdnji bi bila mutacija Met174 u arginin te kinetički testovi provjere specifičnosti prema aminokiselinama.



Slika 5.2. Poravnanje proteinskih sekvenci metanogenih SerRS (iz *M. barkeri*, *M. maripaludis*, i *M. kandleri*) i aa:CP-ligaza (Atu2573 – At Ala:CP-ligaza, Bll0957 – Bj Gly:CP-ligaza 1 i Bll6282 – Bj Gly:CP-ligaza 2). Crnim strelicama označene su aminokiseline aktivnog mjesta koje koordiniraju cinkov ion, a crvenom strelicom označen je Arg očuvan kod mSerRS i Met očuvan kod aa:CP-ligaza. Također su označeni aminokiselinski dijelovi koji odgovaraju motivima 1, 2 i 3 koji su karakteristični za aaRS razreda II, te zavojnica-okret-zavojnica motiv nađen u mSerRS.

Slično kao i kod SerRS metanogenog tipa, a i ostalih bakterijskih SerRS^{5,7}, za nemogućnost vezanja aminokiseline treonina vjerojatno je odgovoran hidrofilni džep koji je kod mMbSerRS građen od Asn435 i Ser437⁹⁰, a u Gly:CP-ligaze zamijenjen sa Ser253 i Asn255 (slika 5.1). Jedan od izazova točne katalize Gly:CP-ligaze jest učinkovito razlikovanje i aktiviranje glicina umjesto alanina. Kod At Ala:CP-ligaze očuvane su skoro sve aminokiseline aktivnog mjesta kao i kod Bj Gly:CP-ligaze 1, uključujući i Met174. Umjesto Ala281 koji se kod Gly:CP-ligaze nalazi u blizini glicinskog dijela adenilata i tvori hidrofobnu interakciju s C^α atomom glicina, vjerojatno se kod Ala:CP-ligaze nalazi Gly296 (prema predikciji strukture Ala:CP-ligaze napravljene pomoću PSI-servera). Prisustvo jedne metilne skupine više kod Gly:CP-ligaze moglo bi utjecati na pravilno smještanje alanina u

aktivno mjesto. Osim mutacijskih analiza, struktura At Ala:CP-ligaze s AlaAMS-om u aktivnom mjestu mogla bi potvrditi ove pretpostavke.

Dok je misaktivacija treonina kod mMbSerRS gotovo nemoguća u živom organizmu, u slučaju ligaza oslabljena selektivnost prema aminokiselini mogla bi imati i nešto značajniju ulogu u stanici. Povećana promiskuitetnost ligaza ukazuje na to kako odabir točne aminokiseline možda nije krajnje nužan kod njene konačne uloge u stanici, te da ta uloga nije značajna za vijabilnost stanice u usporedbi s točnim prepoznavanjem aminokiseline koje aaRS imaju u biosintezi proteina. To upućuje da bi aa:CP-ligaze mogle sudjelovati u nekom procesu sekundarnog metabolizma ili da se radi o relativno ranom evolucijskom procesu s ciljem stvaranja enzima novih funkcija.

5.2 Redoslijed vezanja i konformacijske promjene izazvane vezanjem supstrata

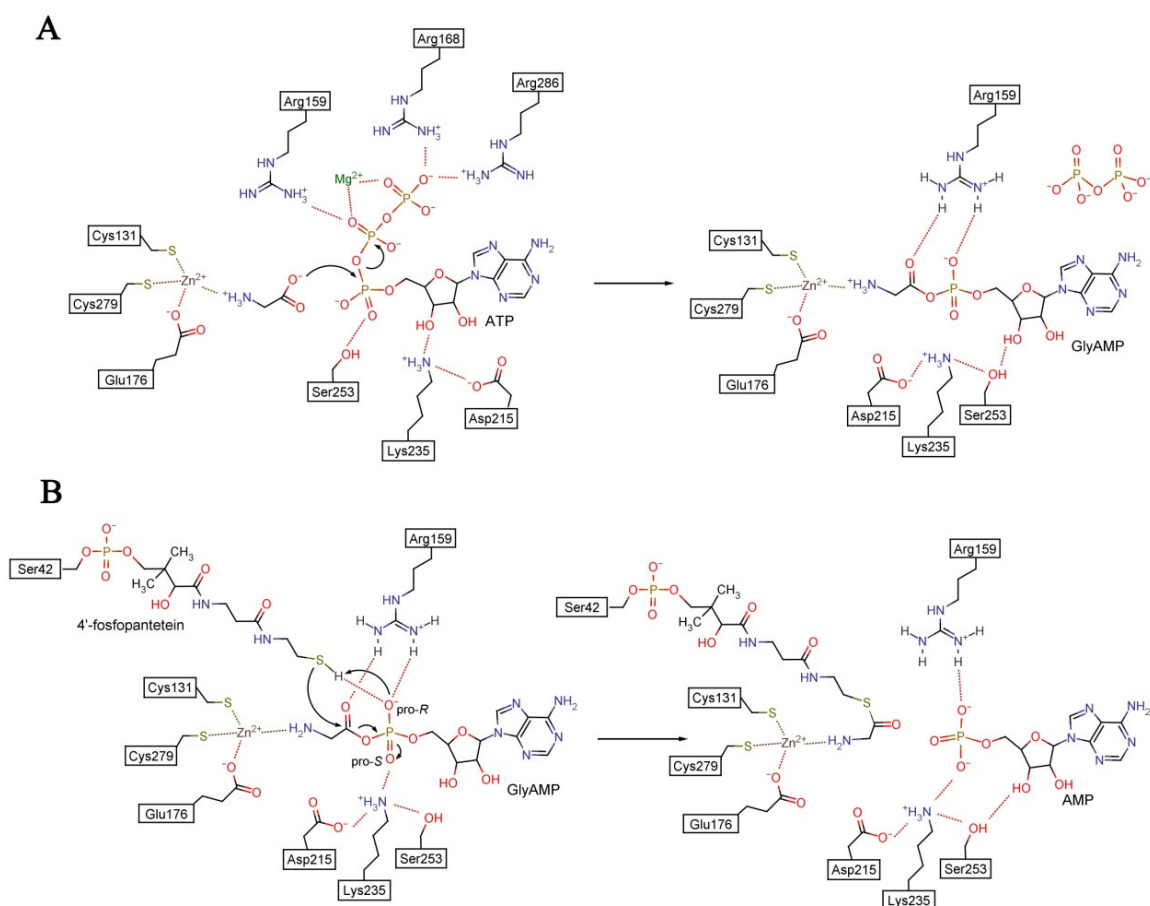
Iz opisanih struktura Bj Gly:CP-ligaze 1 s malim supstratima u aktivnom mjestu može se pretpostaviti da glicin i ATP ulaze u aktivno mjesto prije vezanja odgovarajućeg protein-nosača. Kako je u svim strukturama ligaze, pa čak i u strukturama dobivenim snimanjem nenamakanih kristala nađen barem adenzin-monofosfatni dio ATP-a, može se pretpostaviti da se ATP veže u aktivno mjesto enzima bez nužne prisutnosti aminokiseline ili CP-a. Za razliku od mMbSerRS, kod Gly:CP-ligaze nisu primijećene nikakve značajne konformacijske promjene prilikom vezanja malih supstrata. Kod mMbSerRS, dio od 15 aminokiselina (394-410), potpuno je neuređen u strukturi apo-forme enzima, te vezanjem serina u aktivno mjesto postaje uređeno u obliku kratke α -zavojnice iza koje slijedi omča, nazvane serin-uređujućom omčom. Pri tome dvije aminokiseline dolaze u direktni kontakt sa serinom: Gln400 koji stupa u interakciju s karbonilnom skupinom serina i Trp396 koji se smješta nad amino skupinu i zatvara aktivno mjesto. Kod Bj Gly:CP-ligaze 1 serinsku omču zamjenjuje omča (aminokiseline 213-219), te duga α -zavojnica (220-232) nazvane omča-zavojnica motiv, koje su smještene podalje od aktivnog mjesta i ne ostvaruju nikakve kontakte s analogom glicil-adenilata. Zanimljivo je da je kod svih struktura ligaze s malim supstratima omča-zavojnica motiv uređen samo u jednoj podjedinici enzima, dok je u drugoj ili vrlo slabo vidljiv ili potpuno neuređen. Uređenija omča-zavojnica ostvaruje puno više kristalnih kontakata od neuređene, te je vjerojatno u otopini skoro u potpunosti izložena otapalu i vrlo fleksibilna. U strukturama Bj Gly:CP-ligaze 1 s protein-nosačem u kompleksu, protein-nosači vezani su na

ligazu isključivo preko α -zavojnice u omča-zavojnica motivu, pri čemu su one znatno uređenije nego u strukturi same ligaze. To ukazuje na mogućnost da tijekom vezanja protein-nosača dolazi do formiranja ili uređenja omča-zavojnica motiva pri čemu se dodatno zatvara aktivno mjesto i omogućuju optimalni uvjeti za drugi korak reakcije. Namakanjem kristala kompleksa ligaza:protein-nosač u otopinama malih liganada te pregledom snimljenih i riješenih struktura nađeno je da se oni uspješno vežu u aktivno mjesto uz prisutnost protein-nosača. Dodatno, u jednom aktivnom mjestu strukture kompleksa čiji su kristali namakani u glicinu i ATP-u nađen je konačni produkt enzimske reakcije čime je potvrđeno da je enzim funkcionalan i u kristalu. Iz svih riješenih struktura može se zaključiti da se mali supstrati vežu u aktivno mjesto bez obzira na prisutnost makromolekulskog supstrata protein-nosača.

5.3 Mehanizam djelovanja *B. japonicum* glicin:[protein-nosač]-ligaze

1

Obzirom na način vezanja ATP-a i analoga glicil-adenilata u aktivno mjesto te očuvanost strukture aktivnog mjesta Bj Gly:CP-ligaze 1, može se pretpostaviti da se prvi korak reakcije, aktivacija glicina, odvija istim mehanizmom kao i kod aaRS razreda II. Negativno nabijene fosfatne skupine u svijenoj konformaciji ATP-a međusobno su vrlo blizu, te su stabilizirane ionom Mg^{2+} i bočnim skupinama arginina 159, 168 i 286, te Lys235. Struktura Bj Gly:CP-ligaze 1 s GlyAMS-om pokazala je da je glicil-adenilat u izduženoj konformaciji što je način vezanja karakterističan za aaRS razreda II, te ukazuje na mehanizam aktivacije koji uključuje inverziju konfiguracije α -fosfatne skupine ATP-a. Iz navedenog se može zaključiti da se reakcijski mehanizam aktivacije glicina odvija S_N2 reakcijom karakterističnom za aaRS razreda II koja uključuje nukleofilni napad karboksilne skupine glicina na α -fosfat ATP-a i nastanak pentakoordiniranog prijelaznog stanja (slika 5.3A).



Slika 5.3. Mehanizam Bj Gly:CP-ligaze. **A** Aktivacija glicina ATP-om pri čemu nastaje intermedijer glicil-adenilat (GlyAMP). **B** Drugi korak reakcije – prijenos aktiviranog glicina s GlyAMP-a na 4'-fosfopantetein.

U drugom koraku reakcije sulfhidrilna skupina Ppant-a nukleofilno napada karbonilni atom GlyAMP-a pri čemu nastaje tioesterska veza. Struktura kompleksa ligaze s protein-nosačem i GlyAMS-om pružila je uvid u mehanizam odvijanja drugog koraka reakcije. Tiolna skupina Ppant-a je orijentirana prema pro-*R* nepremošćujućem kisiku sulfatnog dijela GlyAMS-a (analogan fosfatnom dijelu GlyAMP-a) koji može imati ulogu primanja protona sa sulfhidrilne skupine čineći je tako povoljnim nukleofilom za reakciju. Pri tome bočna skupina konzerviranog Arg159 koja ostvaruje vodikovu vezu s pro-*R* kisikom može dodatno polarizirati reakcijske skupine. Također, Arg159 zajedno s Lys235 koji tvori vodikovu vezu s pro-*S* kisikom GlyAMS-a, sudjeluje u stabilizaciji negativnih naboja tijekom nastanka prijelaznog stanja. U strukturama kompleksa s AMP-om i ATP-om primijećeno je da je tiolna skupina orijentirana prema bočnom ogranku His257. His257 se nalazi u blizini reakcijskog centra i također bi mogao imati funkciju baze koja oduzima proton SH-skupini Ppant-a. No, mutacija His257 u alanin, te popratni kinetički testovi, pokazali su da ova aminokiselina ima zanemariv utjecaj na katalitičku aktivnost Bj Gly:CP-ligaze 1. Uz His257, također su mutirane ostale aminokiseline aktivnog mjesta koje bi mogle djelovati kao potencijalne baze

(Tyr132, Asp215). Dok mutacija Y132F nema utjecaja na odvijanje reakcije, mutant D215A bio je katalitički potpuno neaktivan (rezultati dr. sc. Marka Močiboba). Asp215 orijentira Lys235 koji je ključan za aktivaciju glicina, te je teško donositi zaključke o njihovoj ulozi u drugom koraku reakcije. Iz navedenog se može predložiti da se stvaranje tioesterske veze odvija tzv. usklađenim mehanizmom potpomognutim supstratom, bez direktnog utjecaja aminokiselina proteina tijekom prijenosa glicina s adenilata na protein-nosač (slika 5.3.B). Predloženi mehanizam sličan je mehanizmu prijenosa aminokiseline na tRNA nađenih kod aaRS poput AspRS⁹¹ i HisRS.⁸⁶

5.4 Važnost prisutnosti prostetičke skupine Ppant u formiranju ligaza-CP kompleksa

Kinetičkim testovima je pokazano da aa:CP-ligaze specifično vežu odgovarajući protein-nosač (dr. sc. Marko Močibob), pri čemu su vrijednosti K_M za CP-ove (1,19 μM za Bj Gly:CP-ligazu 1 i 4,7 μM za At Ala:CP-ligazu) usporedive s vrijednostima K_M mMbSerRS za tRNA^{Ser}⁷, te adenilacijskim domenama poput DltA iz *B. subtilis* koji je odgovoran za vezanje D-Ala na protein-nosač Dcp i EntE iz *E. coli* koji acilira CP-domenu proteina EntB u biosintezi siderofora ($K_M = 23 \mu\text{M}$). Acil-protein-nosači (ACP) koji sudjeluju u biosintezi masnih kiselina, sadrže identičnu prostetičku skupinu kao CP-ovi aa:CP-ligaza, te im strukturno vrlo nalikuju. Unatoč tome, kinetički je pokazano da ACP-ovi nisu supstrati aa:CP-ligaza, što ukazuje na zaključak kako Ppant prostetička skupina nije odgovorna za prepoznavanje i vezanje protein-nosača na ligazu već da se interakcija ostvaruje isključivo prepoznavanjem dvaju odgovarajućih proteina. Iz struktura kompleksa CP-a i ligaze može se uočiti da Ppant ne ostvaruje skoro nikakve vodikove veze s ligazom i da je tunel kroz koji ulazi u aktivno mjesto relativno širok. Napravljeno je nekoliko mutacija Bj Gly:CP-ligaze 1 s ciljem zatvaranja aktivnog mjesta i sprečavanja ulaska prostetičke skupine (S84Y, S84W, Y132F), no mutanti su unatoč smanjenoj aktivnosti aktivacije glicina (oko 30 %) i dalje uspješno aminoacilirali CP. Fleksibilnost prostetičke skupine u tunelu ide u prilog tvrdnji da prisutnost Ppant-a nije ključna za vezanje protein-nosača na ligazu. Dodatan pokazatelj je i struktura Bj Gly:CP-ligaze 1 u kompleksu s CoA, koji se pokazao kao jedan od mogućih akceptora aktivirane aminokiseline, samo znatno slabiji od Bj CP-a. Neproduktivno vezanje CoA na mjesto gdje se inače veže ATP ukazuje da Ppant i ligaza ostvaruju vrlo slabe interakcije. No, eksperimentima izotermalne titracijske kalorimetrije i „pull-down“ testovima vezanja apo-CP-a na ligazu, pokazalo se suprotno očekivanjima da CP-ovi bez prostetičke

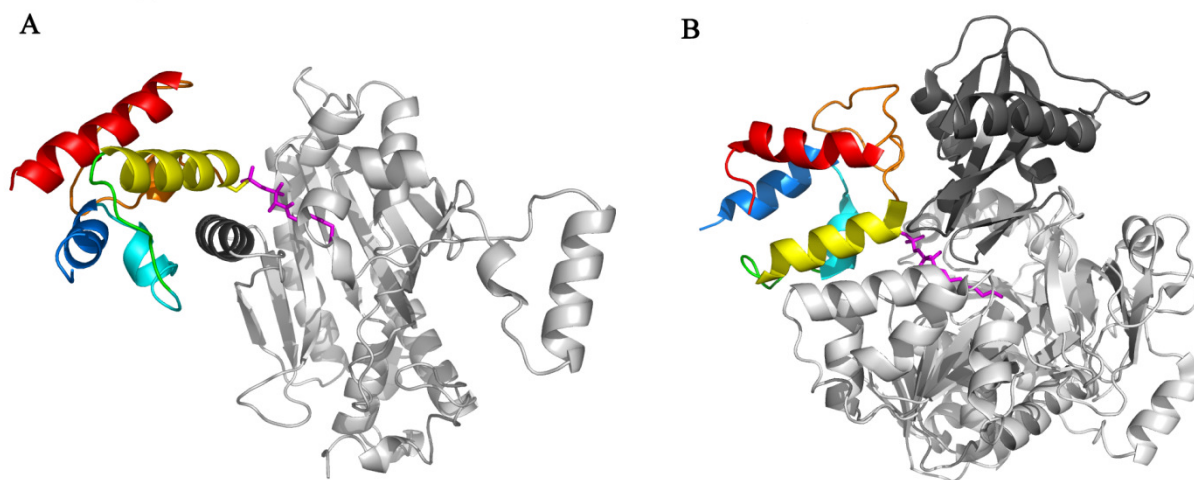
skupine ne stupaju u interakciju s aa:CP-ligazom. Moguće je da vezanje prostetičke skupine na protein-nosač inducira određene strukturne promjene u CP-u omogućujući tako pravilnu interakciju s ligazom. Tako na primjer, peptidil-protein-nosač (PCP), koji ima važnu ulogu prijenosa peptida u neribosomalnoj biosintezi tirocidina A, poprima nove konformacije vezanjem prostetičke skupine.⁶⁴ Poprimanjem različitih konformacija PCP-i su sposobni kontrolirati interakcije s više različitih domena ili enzima, pri čemu je svaka konformacija kompetentna za interakciju samo s jednim od njih. Usporedbom strukture At CP-a iz kompleksa s hibridnom ligazom te NMR-om riješene strukture At apo-CP-a (PDB kod 2JQ4) nisu uočljive značajne strukturne razlike između apo- i holo-forme, no moguće je da vezanje Ppant-a na CP doprinosi strukturnoj dinamici proteina što mu omogućuje uspješno prepoznavanje ligaze. Detaljne NMR analize dviju formi CP-a u otopini pružile bi točniji odgovor na ovo pitanje. Također je moguće da prisutnost prostetičke skupine na CP-u utječe na stabilizaciju omča-zavojnica motiva i samo zatvaranje aktivnog mjesta čime dodatno stabilizira nastali kompleks.

5.5 Prepoznavanje odgovarajućeg protein-nosača

Kristalna struktura Bj Gly:CP-ligaze 1 u kompleksu s Bj CP otkrila je da se prepoznavanje dvaju proteina odvija isključivo preko α -zavojnice ligaze nazvane CP-vezna zavojnica koja je dio omča-zavojnica motiva karakterističnog za aa:CP-ligaze. Za razliku od odgovarajućeg motiva nađenog kod mMbSerRS (serinska omča), CP-vezna zavojnica uopće ne utječe na prepoznavanje i vezanje aminokiseline. Priređen je mutant s deletiranim omča-zavojnica motivom (dr. sc. Marko Močibob), za koji se pokazalo da nije sposoban vezati CP, ali niti aktivirati glicin. Vjerojatan razlog tomu jest što mutantu nedostaje aminokiselina Asp215 koja ostvaruje interakciju s Lys235 bitnom za stabilizaciju glicil-adenilata. Kako bi se potvrdilo da je omča-zavojnica motiv odgovoran za vezanje CP-a, priređena je hibridna ligaza kojoj je omča-zavojnica iz Bj Gly:CP-ligaze 1 zamijenjena s odgovarajućom iz At Ala:CP-ligaze. Dobiveni rezultati nedvojbeno su potvrdili važnost i dominaciju omča-zavojnice motiva u prepoznavanju i vezanju odgovarajućeg CP-a. Hibridna ligaza poprimila je novu funkciju: kovalentno veže aminokiselinu glicin na At CP. Kristalna struktura kompleksa hibridne ligaze i At CP-a, te njena usporedba s kompleksom Bj Gly:CP-ligaze i Bj CP-a otkrili su način specifičnog prepoznavanja makromolekulskog kompleksa kod aa:CP-ligaza. Razlike u orijentaciji, obliku i nabijenosti C-kraja CP-zavojnica su odgovorne za specifičnost aa:CP-ligaza. Kao dodatna potvrda ovim tvrdnjama mogli bi se konstruirati mutanti CP-a koji

bi ukazali na to koji su dijelovi protein-nosača odgovorni za prepoznavanje odgovarajuće ligaze.

Protein-nosač obuhvaća CP-veznu zavojnicu pomoću α -zavojnica II i III (slika 4.16A). Ovakav način interakcije između enzima i odgovarajućeg protein-nosača do sada nije primijećen, te od svih do sada poznatih enzima koji međudjeluju s protein-nosačima, nije nađen niti jedan motiv sličan CP-veznoj zavojnici. Nedavno je riješena struktura adenilacijske domene EntE u kompleksu s aril-protein-nosačem.⁶³ Ova domena funkcionalno je analogna aa:CP-ligazama, no strukturno se potpuno razlikuje. EntE i EntB koja u sebi sadrži CP-domenu sudjeluju u neribosomskoj sintezi siderofore enterobaktina u *E. coli*. Adenilacijska domena EntE građena je od veće N-terminalne i manje C-terminalne poddomene koje formiraju šupljinu u kojoj je smještena EntB CP domena. EntE ostvaruje interakciju s α -zavojnicom II CP-a i dugom omčom koja povezuje zavojnice II i III (slika 5.4). Dok se način interakcije ovih dvaju funkcionalno istih sustava potpuno razlikuje, Ppant skupina pokazuje sličnost pri načinu smještanja u aktivno mjesto. Tunel kroz koji prolazi prostetička skupina u izduženoj formi je širok pri čemu ona ne ostvaruje jake interakcije s adenilacijskom domenom.



Slika 5.4. Usporedba struktura Bj Gly:CP-ligaze 1 (A) i adenilacijske domene EntE (B) u kompleksu s odgovarajućim CP-om. α -zavojnice CP-a obojane su sljedećim redoslijedom: α -zavojnica I – crveno, omča I – narančasto, α -zavojnica II – žuto, omča II – zeleno, α -zavojnica III i omča iza – svijetlo plavo, α -zavojnica IV – plavo. Prostetička skupina je obojana ljubičasto. Radi jednostavnosti je prikazana samo jedna podjedinica ligaze. Tamno sivom bojom je naglašen dio ligaze bitan za interakciju s CP-om (A), odnosno C-terminalna domena EntE (B).

5.6 Uloga aminokiselina:[protein-nosač]-ligaza

Iako su aa:CP-ligaze homolozi atipičnih SerRS metanogenog tipa koji su zadržali strukturnu sličnost katalitičke domene, imaju promijenjenu specifičnost prema oba supstrata. Dok je aktivno mjesto ostalo gotovo nepromijenjeno, a samim time se održalo svojstvo vezanja aminokiseline (iako ne iste), protein-nosač i tRNA nemaju nikakve sličnosti. Čak i prostetička skupina protein-nosača ulazi u aktivno mjesto sa strane suprotne onoj predloženoj za ulazak tRNA u mMbSerRS.⁷ Sve to ukazuje da su ovi homolozi znatno divergirali od seril-tRNA-sintetaza i njihove funkcije u ribosomskoj biosintezi proteina. Do sada je poznat niz aaRS-sličnih proteina koji su nastali duplikacijama aaRS gena ili horizontalnim prijenosom, pri čemu su oni poprimili funkcije različite od sintetaznih.

Biološka uloga aa:CP-ligaza je zasad još uvijek nepoznata. Svojim djelovanjem one jako podsjećaju na adenilacijske domene prisutne u neribosomskim peptidnim sintetazama (NRPS) koje aminoaciliraju Ppant prostetičku skupinu susjednih peptidil-nosač domena (PCP).⁶⁴ U stanicama također postoje samostojeći adenilacijski enzimi koji aminoaciliraju PCP-ove *in trans*. No, osim funkcionalno, aa:CP-ligaze ni evolucijski niti strukturno ne podsjećaju na adenilacijske enzime.

Jedna od hipoteza funkcije aa:CP-ligaza jest sudjelovanje u biosintezi prirodnih spojeva, pri čemu bi predstavljale zamjenu za adenilacijske domene u neribosomalnoj sintezi peptida čime bi onda bile direktna poveznica između ribosomalne i neribosomalne sinteze peptida. Osim toga, aminoacilirani protein-nosači bi mogli biti sudionici nekog od mnogih bioloških procesa u kojima se koristi prijenos acilnih skupina, poput sinteze masnih kiselina i poliketida, membranskih oligosaharida, molekula na površini stanice bitnih za međustaničnu komunikaciju ili signalnih molekula. Aravind i sur. su pretražujući konzerviranu okolicu gena za Bj Gly:CP-ligazu, uz gene za Bj CP i monooksigenazu/dehidrogenazu s Rossmannovim tipom smatanja, povezali Gly:CP-ligazu s visoko konzerviranim još neokarakteriziranim proteinom, glikozidazom i drugim proteinima uključenima u biosintezu liposaharida.⁹² To ukazuje da bi aa:CP-ligaze mogle imati ulogu u ligaciji aminokiselina na šećerne derivate na površini stanica.

Nedavno je opisan genski klaster za biosintezu gvaadinomina iz *Streptomyces* sp. K01-0509.⁹³ Gvaadinomini su nedavno otkriveni spojevi za koje se pokazalo da imaju anti-infektivna svojstva.⁹⁴ Sekvencioniranjem klastera je nađeno da se među dvadesetak proteina

potrebnih u biosintezi gvadinomina nalazi i gen *gdnB*, homologan seril-tRNA-sintetazama. Pretpostavlja se da u biosintetičkom putu GdnB aktivira serin pomoću ATP-a te veže na GdnC, pri čemu nastaje seril-ACP intermedijer.⁹³ Detaljnije analize GdnB proteina i usporedba s Bj Gly:CP ligazom 1 opisanom u ovoj disertaciji mogle bi biti smjernica prema utvrđivanju funkcije aa:CP-ligaza.

6 ZAKLJUČCI

Uspješno je kristalizirana, te metodom difrakcije rendgenskih zraka na kristalu riješena struktura Bj Gly:CP-ligaze 1 do razlučivanja 2,15 Å. Također su riješene strukture Bj Gly:CP-ligaze 1 u kompleksu s ATP-om, te analogom glicil-adenilata u aktivnom mjestu. Usporedba sa strukturom mMbSerRS pokazala je da su osim nedostatka tRNA-vezne domene, katalitička domena i aktivno mjesto Bj Gly:CP-ligaze 1 očuvani. U aktivnom mjestu su identificirane aminokiseline Bj Gly:CP-ligaze 1 (metionin-174 i alanin-281) koje bi mogle biti odgovorne za diskriminaciju vezanja glicina od ostalih aminokiselina, ponajviše serina. Pokazano je da se ATP veže u ligazu u svijenoj konformaciji, na način svojstven aaRS razreda II. Amino skupina glicina orijentirana je prema cinkovom ionu u aktivnom mjestu, pri čemu je analog glicil-adenilata u ispruženoj konformaciji, iz čega se može zaključiti da je mehanizam aktivacije glicina ATP-om očuvan u skladu s aaRS razreda II. Najveća strukturna razlika između katalitičkih domena Bj Gly:CP-ligaze 1 i mMbSerRS jest u području „serinske omče“ koja kod mMbSerRS poprima definiranu konformaciju vezanjem serina. Kod Bj Gly:CP-ligaze 1 ona je zamijenjena motivom omča-zavojnica, te je pokazano da on ne sudjeluje u prepoznavanju i vezanju glicina. Riješena je kristalna struktura kompleksa Bj Gly:CP-ligaze 1 i Bj CP do razlučivanja 2,15 Å koja je pokazala da se Bj CP veže na Bj Gly:CP-ligazu 1 isključivo preko zavojnice motiva omča-zavojnica, te je ona nazvana CP-vezna zavojnica. Strukture kompleksa s malim ligandima (ATP-om i analogom glicil-adenilata) pokazale su da je njihov način vezanja isti kao i kod same Bj Gly:CP-ligaze 1. Namakanjem kristala kompleksa u kristalizacijskoj otopini s glicinom i ATP-om, u jednom aktivnom mjestu je nađen konačni produkt reakcije, glicin kovalentno vezan na prostetičku skupinu Bj CP-a. Pregledom navedenih struktura predložen je usklađeni mehanizam potpomognut supstratom drugog koraka reakcije prijenosa aktiviranog glicina na CP. Struktura hibridne Gly:CP-ligaze u kompleksu s At CP riješena je do razlučivanja 1,95 Å te je pokazala da se At CP veže na At CP-veznu zavojnicu ligaze, ali na neočekivano drugačiji način. Usporedba struktura dvaju kompleksa pokazala je da su razlike u orijentaciji, obliku i nabijenosti C-terminalne regije CP-zavojnica odgovorne za specifičnost aa:CP-ligaza prema odgovarajućem CP-u.

7 LITERATURN A VRELA

1. M. Ibba, D. Soll, *Annu. Rev. Biochem.* **69** (2000) 617-650.
2. F. H. Crick, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **12** (1958) 138-163.
3. P. Schimmel, L. R. De Pouplana, *Trends Biochem. Sci.* **25** (2000) 207-209.
4. D. Korenčić, I. Ahel, D. Soll, *Food Technol. Biotechnol.* **40** (2002) 255-260.
5. H. Belrhali, A. Yaremchuk, M. Tukalo, K. Larsen, C. Berthet-Colominas, R. Leberman, B. Beijer, B. Sproat, J. Als-Nielsen, G. Grubel, *Science* **263** (1994) 1432-1436.
6. S. Cusack, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7** (1997) 881-889.
7. S. Bilokapić, T. Maier, D. Ahel, I. Gruić-Sovulj, D. Soll, I. Weygand-Đurašević, N. Ban, *EMBO J.* **25** (2006) 2498-2509.
8. M. Močibob, N. Ivić, S. Bilokapić, T. Maier, M. Luić, N. Ban, I. Weygand-Đurašević, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** (2010) 14585-14590.
9. S. Schmelz, J. H. Naismith, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19** (2009) 666-671.
10. J. G. Arnez, D. Moras. (2001), *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd.
11. J. J. Perona, A. Hadd, *Biochemistry* **51** (2012) 8705-8729.
12. M. Guo, Y. E. Chong, R. Shapiro, K. Beebe, X. L. Yang, P. Schimmel, *Nature* **462** (2009) 808-U134.
13. D. Korenčić, I. Ahel, J. Schelert, M. Sacher, B. Ruan, C. Stathopoulos, P. Blum, M. Ibba, D. Soll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) 10260-10265.
14. S. An, K. Musier-Forsyth, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 42359-42362.
15. I. Ahel, D. Korenčić, M. Ibba, D. Soll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (2003) 15422-15427.
16. S. G. Park, E. C. Choi, S. Kim, *IUBMB Life* **62** (2010) 296-302.
17. T. K. Bhatt, S. Khan, V. P. Dwivedi, M. M. Banday, A. Sharma, A. Chandele, N. Camacho, L. R. de Pouplana, Y. Wu, A. G. Craig, *Nat. Commun.* **2** (2011) 530.
18. M. Guo, P. Schimmel, X. L. Yang, *FEBS Lett.* **584** (2010) 434-442.
19. M. Guo, X. L. Yang, P. Schimmel, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11** (2010) 668-674.
20. Y. Zeng, H. Roy, P. B. Patil, M. Ibba, S. Chen, *Antimicrob. Agents Chemother.* **53** (2009) 4619-4627.
21. A. Brevet, J. Chen, F. Leveque, S. Blanquet, P. Plateau, *J. Biol. Chem.* **270** (1995) 14439-14444.

22. J. R. Brown, D. Gentry, J. A. Becker, K. Ingraham, D. J. Holmes, M. J. Stanhope, *EMBO Rep.* **4** (2003) 692-698.
23. S. K. Blight, R. C. Larue, A. Mahapatra, D. G. Longstaff, E. Chang, G. Zhao, P. T. Kang, K. B. Green-Church, M. K. Chan, J. A. Krzycki, *Nature* **431** (2004) 333-335.
24. A. Sauerwald, W. Zhu, T. A. Major, H. Roy, S. Palioura, D. Jahn, W. B. Whitman, J. R. Yates, 3rd, M. Ibba, D. Soll, *Science* **307** (2005) 1969-1972.
25. M. Sissler, C. Delorme, J. Bond, S. D. Ehrlich, P. Renault, C. Francklyn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96** (1999) 8985-8990.
26. M. L. Bovee, K. S. Champagne, B. Demeler, C. S. Francklyn, *Biochemistry* **41** (2002) 11838-11846.
27. A. Aberg, A. Yaremchuk, M. Tukalo, B. Rasmussen, S. Cusack, *Biochemistry* **36** (1997) 3084-3094.
28. M. C. Vega, P. Zou, F. J. Fernandez, G. E. Murphy, R. Sterner, A. Popov, M. Wilmanns, *Mol. Microbiol.* **55** (2005) 675-686.
29. C. G. Acotto, H. Niepomniszcze, E. Vega, C. A. Mautalen, *J. Clin. Densitom.* **7** (2004) 201-208.
30. H. Roy, H. D. Becker, J. Reinbolt, D. Kern, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (2003) 9837-9842.
31. S. K. Hinchman, S. Henikoff, S. M. Schuster, *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 144-149.
32. C. Francklyn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (2003) 9650-9652.
33. V. Campanacci, D. Y. Dubois, H. D. Becker, D. Kern, S. Spinelli, C. Valencia, F. Pagot, A. Salomoni, S. Grisel, R. Vincentelli, *J. Mol. Biol.* **337** (2004) 273-283.
34. M. Blaise, H. D. Becker, J. Lapointe, C. Cambillau, R. Giege, D. Kern, *Biochimie* **87** (2005) 847-861.
35. J. C. Salazar, A. Ambrogelly, P. F. Crain, J. A. McCloskey, D. Soll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) 7536-7541.
36. D. Y. Dubois, M. Blaise, H. D. Becker, V. Campanacci, G. Keith, R. Giege, C. Cambillau, J. Lapointe, D. Kern, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) 7530-7535.
37. M. Blaise, V. Olieric, C. Sauter, B. Lorber, B. Roy, S. Karmakar, R. Banerjee, H. D. Becker, D. Kern, *J. Mol. Biol.* **381** (2008) 1224-1237.
38. S. Sekine, M. Shichiri, S. Bernier, R. Chenevert, J. Lapointe, S. Yokoyama, *Structure* **14** (2006) 1791-1799.
39. M. Ibba, C. Francklyn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) 7493-7494.

40. L. W. Tremblay, F. Fan, M. W. Vetting, J. S. Blanchard, *Biochemistry* **47** (2008) 13326-13335.
41. T. Yanagisawa, T. Sumida, R. Ishii, C. Takemoto, S. Yokoyama, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17** (2010) 1136-1143.
42. W. W. Navarre, S. B. Zou, H. Roy, J. L. Xie, A. Savchenko, A. Singer, E. Edvokimova, L. R. Prost, R. Kumar, M. Ibba, *Mol. Cell* **39** (2010) 209-221.
43. Y. Kang, T. Durfee, J. D. Glasner, Y. Qiu, D. Frisch, K. M. Winterberg, F. R. Blattner, *J. Bacteriol.* **186** (2004) 4921-4930.
44. L. Bonnefond, T. Arai, Y. Sakaguchi, T. Suzuki, R. Ishitani, O. Nureki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108** (2011) 3912-3917.
45. M. W. Vetting, S. S. Hegde, J. S. Blanchard, *Nat. Chem. Biol.* **6** (2010) 797-799.
46. L. R. de Pouplana, R. Geslain, *Mol. Cell* **30** (2008) 3-4.
47. S. Cusack, C. Berthet-Colominas, M. Hartlein, N. Nassar, R. Leberman, *Nature* **347** (1990) 249-255.
48. C. M. Taupin, M. Hartlein, R. Leberman, *Eur. J. Biochem.* **243** (1997) 141-150.
49. S. Bilokapić, N. Ivić, V. Godinić-Mikulčić, I. Piantanida, N. Ban, I. Weygand-Đurašević, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 10706-10713.
50. S. Cusack, A. Yaremchuk, M. Tukalo, *EMBO J.* **15** (1996) 2834-2842.
51. T. Guitart, T. Leon Bernardo, J. Sagales, T. Stratmann, J. Bernues, L. R. de Pouplana, *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 38157-38166.
52. X. L. Xu, Y. Shi, H. M. Zhang, E. C. Swindell, A. G. Marshall, M. Guo, S. Kishi, X. L. Yang, *Nat. Commun.* **3** (2012).
53. K. P. Wilson, L. M. Shewchuk, R. G. Brennan, A. J. Otsuka, B. W. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89** (1992) 9257-9261.
54. P. J. Artymiuk, D. W. Rice, A. R. Poirrette, P. Willet, *Nat. Struct. Biol.* **1** (1994) 758-760.
55. C. S. Francklyn, A. Minajigi, *FEBS Lett.* **584** (2010) 366-375.
56. B. P. Duckworth, K. M. Nelson, C. C. Aldrich, *Curr. Top. Med. Chem.* **12** (2012) 766-796.
57. A. C. Mercer, M. D. Burkart, *Nat. Prod. Rep.* **24** (2007) 750-773.
58. D. M. Byers, H. Gong, *Biochem. Cell Biol.* **85** (2007) 649-662.
59. A. Roujeinikova, W. J. Simon, J. Gilroy, D. W. Rice, J. B. Rafferty, A. R. Slabas, *J. Mol. Biol.* **365** (2007) 135-145.

60. M. R. Parsek, D. L. Val, B. L. Hanzelka, J. E. Cronan, Jr., E. P. Greenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96** (1999) 4360-4365.
61. M. J. Cryle, I. Schlichting, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105** (2008) 15696-15701.
62. J. R. Lai, A. Koglin, C. T. Walsh, *Biochemistry* **45** (2006) 14869-14879.
63. J. A. Sundlov, C. Shi, D. J. Wilson, C. C. Aldrich, A. M. Gulick, *Chem. Biol.* **19** (2012) 188-198.
64. A. Koglin, M. R. Mofid, F. Lohr, B. Schafer, V. V. Rogov, M. M. Blum, T. Mittag, M. A. Marahiel, F. Bernhard, V. Dotsch, *Science* **312** (2006) 273-276.
65. T. Maier, S. Jenni, N. Ban, *Science* **311** (2006) 1258-1262.
66. T. Ritsema, A. M. Gehring, A. R. Stuitje, K. M. van der Drift, I. Dandal, R. H. Lambalot, C. T. Walsh, J. E. Thomas-Oates, B. J. Lugtenberg, H. P. Spaink, *Mol. Gen. Genet.* **257** (1998) 641-648.
67. K. T. Osman, L. Du, Y. He, Y. Luo, *J. Mol. Biol.* **388** (2009) 345-355.
68. W. Kabsch, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66** (2010) 125-132.
69. M. D. Winn, C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. Leslie, A. McCoy, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **67** (2011) 235-242.
70. C. Vonrhein, E. Blanc, P. Roversi, G. Bricogne, *Methods Mol. Biol.* **364** (2007) 215-230.
71. C. R. Kissinger, D. K. Gehlhaar, D. B. Fogel, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55** (1999) 484-491.
72. G. Langer, S. X. Cohen, V. S. Lamzin, A. Perrakis, *Nat. Protoc.* **3** (2008) 1171-1179.
73. K. Cowtan, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62** (2006) 1002-1011.
74. P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60** (2004) 2126-2132.
75. G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53** (1997) 240-255.
76. E. Blanc, P. Roversi, C. Vonrhein, C. Flensburg, S. M. Lea, G. Bricogne, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60** (2004) 2210-2221.
77. P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkoczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L. W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66** (2010) 213-221.
78. R. A. Laskowski, M. W. Macarthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, *J. Appl. Crystallogr.* **26** (1993) 283-291.

79. A. A. Vaguine, J. Richelle, S. J. Wodak, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55** (1999) 191-205.
80. V. B. Chen, W. B. Arendall, 3rd, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66** (2010) 12-21.
81. W. L. DeLano. (2002). DeLano Scientific, San Carlos, CA.
82. E. Krissinel, K. Henrick, *J. Mol. Biol.* **372** (2007) 774-797.
83. M. W. Bowler, M. G. Montgomery, A. G. Leslie, J. E. Walker, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62** (2006) 991-995.
84. P. Evans, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62** (2006) 72-82.
85. E. Krissinel, K. Henrick *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60** (2004) 2256-2268.
86. E. Guth, S. H. Connolly, M. Bovee, C. S. Francklyn, *Biochemistry* **44** (2005) 3785-3794.
87. S. Costantini, A. Paladino, A. M. Facchiano, *Bioinformation* **2** (2008) 271-272.
88. N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, J. A. McCammon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98** (2001) 10037-10041.
89. C. R. Woese, G. J. Olsen, M. Ibba, D. Soll, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64** (2000) 202-236.
90. S. Bilokapić, J. Rokov Plavec, N. Ban, I. Weygand-Đurašević, *FEBS J.* **275** (2008) 2831-2844.
91. S. Eiler, A. Dock-Bregeon, L. Moulinier, J. C. Thierry, D. Moras, *EMBO J.* **18** (1999) 6532-6541.
92. L. Aravind, R. F. de Souza, L. M. Iyer, *Biol. Direct* **5** (2010) 48.
93. T. C. Holmes, A. E. May, K. Zaleta-Rivera, J. G. Ruby, P. Skewes-Cox, M. A. Fischbach, J. L. DeRisi, M. Iwatsuki, S. Omura, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* **134** (2012) 17797-17806.
94. M. Iwatsuki, R. Uchida, H. Yoshijima, H. Ui, K. Shiomi, Y. P. Kim, T. Hirose, T. Sunazuka, A. Abe, H. Tomoda, *J. Antibiot. (Tokyo)* **61** (2008) 230-236.

8 PRILOZI

8.1 Popis riješenih struktura

PDB kod	protein	ligandi	razlučivanje / Å	R / R_{free}
3MF2	Bj Gly:CP-ligaza 1	AMP	2,15	0,186/0,246
3MEY		ATP	2,50	0,181/0,231
3MF1		GlyAMS	2,20	0,188/0,228
3PZC		Koenzim A	2,20	0,167/0,223
4H2S	Bj Gly:CP-ligaza 1 + Bj CP	AMP, Ppant	2,15	0,171/0,207
4H2U		ATP, Ppant	2,10	0,175/0,209
4H2T		GlyAMS, Ppant	2,44	0,178/0,217
4H2V		Gly-Ppant, Ppant, AMP	2,00	0,179/0,210
4H2W	Hibridna Gly:CP- ligaza + At CP	AMP, Ppant	1,95	0,172/0,196
4H2Y		ATP, Ppant	2,10	0,176/0,210
4H2X		GlyAMS, Ppant	2,15	0,167/0,198

8.2 Popis kratica

aaAMP	aminoacil-adenilat
aa:CP-ligaza	aminokiselina:[protein-nosač]-ligaza
aaRS	aminoacil-tRNA-sintetaza
aa-tRNA	aminoacil-tRNA
ACP	acil-protein-nosač
AHL-sintaza	<i>N</i> -acilhomoserin-lakton-sintaza
AMP	adenozin-3'-monofosfat
AsnA	asparagin-sintetaza A
At Ala:CP-ligaza	alanin: [protein-nosač]-ligaza iz vrste <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
At CP	protein-nosač iz vrste <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ATP	adenozin-5'-trifosfat
BirA	biotin-sintetaza/represor protein
Bj CP	protein-nosač iz vrste <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
Bj Gly:CP-ligaza 1	glicin: [protein-nosač]-ligaza 1 iz vrste <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
CDPS	ciklodipeptid-sintaza
CoA	koenzim A
CP	protein-nosač, eng. <i>carrier protein</i>
Dcl/DltA	D-alanil:[protein-nosač]-ligaza
Dcp	D-alanil-protein-nosač
EF-P	elongacijski faktor P
FAS	sintaza masnih kiselina, eng. <i>fatty acid synthase</i>
GlcN-Ins	1-D-mio-inozitil-2-amido-2-deoksi- <i>R</i> -D-glukopiranozid

GlyAMS	5'- <i>O</i> -(<i>N</i> -glicil-sulfamoil) adenzin
HisG	<i>N</i> -1-(5'-fosforibozil)-ATP-transferaza
HisZ	paralog histidil-tRNA-sintetaze
HTH	zavojnica-okret-zavojnica, eng. <i>helix-turn-helix</i>
IPTG	izopropil- β -tiogalaktozid
mMbSerRS	metanogena seril-tRNA-sintetaza iz vrste <i>Methanosarcina barkeri</i>
mMkSerRS	metanogena seril-tRNA-sintetaza iz vrste <i>Methanopyrus kandleri</i>
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina
mSerRS	metanogeni tip seril-tRNA-sintetaze
NRPS	neribosomalna peptid-sintetaza
PCP	peptidil-protein-nosač
PCR	lančana reakcija polimeraze, eng. <i>polymerase chain reaction</i>
PEG	polietilen-glikol
PR-ATP	<i>N</i> '-5'-fosforibozil-ATP
PRPP	5'-fosforibozil- α -1-pirofosfat
PKS	poliketid-sintetaze
Ppant	4-fosfopantetein
PP_i	pirofosfat, P ₂ O ₇ ⁴⁻
PPT-aza	4'-fosfopanteteinil-transferaza
rmsd	eng. <i>root-mean-square-deviation</i>
rRNA	ribosomska ribonukleinska kiselina
SerRS	seril-tRNA-sintetaza
tRNA	transfer ribonukleinska kiselina
tRNA^{aa}	tRNA za određenu aminokiselinu
YjeK	paralog lizin 2,3-aminomutaze

Popis aminokiselina (aa)

Ala	(A)	alanin	Met	(M)	metionin
Arg	(R)	arginin	Phe	(F)	fenilalanin
Asn	(N)	asparagin	Pro	(P)	prolin
Asp	(D)	asparaginska kiselina	Pyl	(O)	pirolizin
Cys	(C)	cistein	Sec	(U)	selenocistein
Gln	(Q)	glutamin	Ser	(S)	serin
Glu	(E)	glutaminska kiselina	Thr	(T)	treonin
Gly	(G)	glicin	Trp	(W)	triptofan
His	(H)	histidin	Tyr	(Y)	tirozin
Ile	(I)	izoleucin	Val	(V)	valin
Leu	(L)	leucin			

9 ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Nives Ivić
Datum rođenja: 8. travnja, 1982.
Mjesto rođenja: Zagreb, Hrvatska

OBRAZOVANJE:

2007. - Doktorski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2006. - 2008. Studij kemije, smjer: dipl. ing. kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Tema diplomskog rada: Konstrukcija heterodimera arhealne seril-tRNA-sintetaze i biokemijska analiza komunikacije proteinskih domena, mentor: Ivana Weygand-Đurašević

2000. - 2006. Studij biologije, smjer: prof. biologije i kemije, PMF, Sveučilište u Zagrebu
Tema diplomskog rada: Otkrivanje razvojno specifičnih glikoproteina u kulturi tkiva vrste *Mammillaria gracillis* Pfeiff., mentor: Marijana Krsnik-Rasol

1996. - 2000. II. gimnazija, Zagreb

ZAPOSLENJE:

lipanj 2007. - Znanstveni novak u Laboratoriju za biološku i kemijsku kristalografiju, Zavod za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković

ISKUSTVO U VOĐENJU NASTAVE:

2007. – 2008. Sudjelovanje u vođenju praktikuma kolegija Biologija stanice, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2008. – 2012. Sudjelovanje u vođenju praktikuma iz biokemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

NAGRADE:

- Listopad 2011. EMBO Short Term Fellowship, kratkoročna stipendija za boravak u inozemstvu (trajanje: 30 dana)
- Lipanj 2011. FEBS stipendija za pohađanje 11.-og Young Scientist Forum-a i 36.-og FEBS kongresa: Biochemistry for Tomorrow's Medicine
- Veljača 2011. Godišnja nagrada Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu mladim znanstvenicima i umjetnicima za 2010. godinu
- Prosinac 2010. Godišnja nagrada ravnateljice najuspješnijim znanstvenicima Instituta Ruđer Bošković za 2010. godinu
2002. – 2005. Stipendist Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske

DODATNA USAVRŠAVANJA:

- Listopad 2012. BioCrys 2012 Fundamental of Modern Methods of BioCrystallography 19.–28.10.2012., Oeiras, Portugal
- Lipanj 2012. 45th Course of the International School of Crystallography: Present and Future Methods for Biomolecular Crystallography, 31.05. –10.06.2012., Erice, Italija
- Studeni 2011. Mjesec dana u EMBL Grenoble / ESRF sinkrotron, Francuska kod dr. Hassan Belrhali-ja (24.10.–27.11.2011.)
- Rujan 2009. 10th International Summer School on Biophysics - Supramolecular Structure and Function, 19.09.–01.10.2009., Rovinj, Hrvatska.
- Lipanj 2009. EMBO/MAX-INF2 Practical Course: Structure determination in Macromolecular Crystallography, 14.–20.06.2009., Grenoble, Francuska
- Rujan 2008. EMBO Practical Course: X-ray Crystal Structure Determination of Macromolecules, 14.–20.09.2008., Saint Aubin, Francuska
- Rujan 2008. BCA/CCP4 Protein Crystallography Summer School 2008, 07.–12.09.2008., Oxford, Velika Britanija

ČLANSTVA U UDRUGAMA:

- Hrvatsko kemijsko društvo
- Hrvatska kristalografska zajednica
- Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju

ZNANSTVENI RADOVI U ČASOPISIMA:

1. M. Močibob, N. Ivić, M. Luić, I. Weygand-Đurašević, Adaptation of Aminoacyl-tRNA Synthetase Catalytic Core to Carrier Protein Aminoacylation, *Structure* **21** (2013) 614-626.
2. T. Paradžik, N. Ivić, Ž. Filić, B. A. Manjasetty, P. Herron, M. Luić, D. Vujaklija, Structure–function relationships of two paralogous single-stranded DNA-binding proteins from *Streptomyces coelicolor*: implication of SsbB in chromosome segregation during sporulation, *Nucleic Acids Res.* **41** (2013) 3659–3672.
3. M. Močibob, N. Ivić, D. Subašić, M. Luić, I. Weygand-Đurašević, Substrate Recognition by Novel Family of Amino Acid:[Carrier Protein] Ligases, *Croat. Chem. Acta* **84** (2011) 149-157.
4. I. Lešćić Ašler, N. Ivić, F. Kovačić, S. Schell, J. Knorr, U. Krauss, S. Wilhelm, B. Kojić-Prodić, K.E. Jaeger, Probing enzyme promiscuity of SGNH hydrolases, *Chembiochem* **11** (2010) 2158-2167.
5. M. Močibob, N. Ivić, S. Bilokapić, T. Maier, M. Luić, N. Ban, I. Weygand-Đurašević, Homologs of aminoacyl-tRNA synthetases acylate carrier proteins and provide a link between ribosomal and nonribosomal peptide synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107** (2010) 14585-14590.
6. S. Bilokapić, N. Ivić, V. Godinić-Mikulčić, I. Piantanida, N. Ban, I. Weygand-Đurašević, Idiosyncratic helix-turn-helix motif in *Methanosarcina barkeri* seryl-tRNA synthetase has a critical architectural role, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 10706-10713.

PRIOPĆENJA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA:

1. FEBS kongres: Biochemistry for Tomorrow's Medicine, Torino, Italija, 25.-30.06.2011., s posterom: Structural studies of amino acid:[carrier protein] ligase in the complex with carrier protein, autori: N. Ivić, M. Močibob, I. Weygand-Đurašević and M. Luić
2. 11th Young Scientist Forum, Torino, Italy, 23.-25.06.2011., usmeno priopćenje: Structural studies of amino acid:[carrier protein] ligase in the complex with carrier protein, autori: N. Ivić, M. Močibob, I. Weygand-Đurašević and M. Luić
3. XXII. Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers, Zagreb, Hrvatska, 13.-16.02.2011., s posterom: Kristalna struktura glicin:[protein-nosač]-ligaze u kompleksu

s pripadnim protein-nosačem, autori: N. Ivić, M. Močibob, I. Weygand-Đurašević and M. Luić

4. 50 godina molekularne biologije u Hrvatskoj, Zagreb, Hrvatska, 20. - 21. 11. 2008.